

**Univerzita Karlova v Praze**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Fyzikální chemie



**Bc. Ludmila Müllerová**

**Stanovení elektroforetické mobility alkalických kationtů v micelárních systémech**

Determination of electrophoretic mobility of alkaline cations in micellar systems

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

Školitel: Prof. RNDr. Bohuslav Gaš, CSc.

Praha, 2011

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze,

Podpis

**Poděkování:**

Děkuji svému školiteli Prof. RNDr. Bohuslavu Gašovi, CSc. za vedení mé práce a za možnost pracovat v jeho výzkumné skupině; Mgr. Pavlu Dubskému, Ph.D. za pomoc a vedení, Mgr. Janě Svobodové za mnohé cenné rady; všem členům skupiny Elektromigračních separačních procesů za podporu a příjemné pracovní prostředí a svým rodičům nejen za trpělivost.

## Abstrakt

Micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC) je široce používaná analytická separační metoda. Pro dosažení separace využívá interakci analytů s nabitými micelami obsaženými v základním elektrolytu (BGE). Přítomnost nabitých micel ovlivňuje nejen mobility analytů, ale i mobility malých anorganických iontů, které jsou obvykle součástí BGE. Pochopení těchto interakcí je nezbytné ke zpřesnění modelů popisujících separace v BGE obsahujících micely.

Ke stanovení fyzikálně chemických konstant (například interakčních konstant a mobilit komplexů) pomocí kapilární elektroforézy je třeba přesně určit hodnoty efektivních mobilit. K tomu je nutné i přesné stanovení mobility elektroosmotického toku (EOF), to je ale v BGE obsahujícím nabitě micely problematické, protože může docházet k interakci neutrálního EOF markeru s micelami a tím k jeho mobilizaci.

V rámci této práce byla navržena nová dvoudetektorová metoda stanovení efektivní mobility v BGE obsahujícím interagující složku. Při této metodě se analyt nachází v BGE obsahujícím nabitě micely, zatímco EOF marker je obklopen BGE bez micel a nemůže tedy s micelami interagovat.

Navrženou dvoudetektorovou metodou byly stanoveny mobility sodného kationtu v závislosti na koncentraci dodecylsulfátu lithného tvořícího micely. Současně byly použity různé způsoby zpracování takto získaných experimentálních dat a bylo zhodnoceno, která zjednodušení lze použít bez ztráty přesnosti výsledků. Na základě výsledků dvoudetektorové metody bylo zjištěno, že thiomočovina je vhodným neutrálním markerem pro BGE obsahující dodecylsulfátové micely.

Protože dvoudetektorová metoda využívá mobilizaci obsahu kapiláry aplikací tlaku, je její fungování do jisté míry závislé na spolehlivosti a dobré reprodukovatelnosti pohybu roztoku kapilárou v důsledku aplikace tlaku. Proto byla provedena měření viskozity roztoků pomocí instrumentace pro kapilární elektroforézu a byl vyhodnocen vliv experimentálních faktorů a způsobu zpracování experimentálních dat na stanovení viskozity. Z výsledků vyplývá, že přestože instrumentace pro kapilární elektroforézu není zcela vhodná pro stanovování absolutních hodnot viskozit, tato nepřesnost nemá vliv na fungování navržené dvoudetektorové metody.

Dále byly změřeny závislosti efektivních mobilit alkalických kationtů cesného, draselného a sodného na koncentraci dodecylsulfátu lithného za použití thiomočoviny jako EOF markeru. Vyhodnocení získaných dat pomocí obecně používaného modelu poskytuje nerealistické hodnoty mobilit komplexů kationtu s micelou. Z toho vyplývá, že tento běžně používaný model je pro malé anorganické ionty zcela nevyhovující. Zpřesnění tohoto modelu bude předmětem dalšího studia.

## Abstract

Micellar electrokinetic chromatography is a widely used analytical separation technique. To achieve separation, it uses interaction of analytes with charged micelles present in the background electrolyte (BGE). Not only the mobilities of analytes but also mobilities of small inorganic ions, usually contained in the BGE, are influenced by the presence of micelles. Description of interactions between inorganic ions and micelles is needed for better understanding electrophoretic separations in BGEs containing micelles.

Determination of physico-chemical constants (interaction constants, mobilities of complexes) by capillary electrophoresis is based on accurate determination of effective mobilities. For this reason, accurate determination of mobility of electroosmotic flow (EOF) is also necessary but complicated in BGEs containing charged micelles, because the neutral EOF marker can be mobilized by interaction with the micelles.

In this work a new two-detector method for determination of effective mobility in interacting BGEs was proposed. In this method the analyte is placed in the BGE containing charged micelles, while the marker zone is in the BGE without micelles and so the possible interaction is avoided.

Using this method, dependence of sodium cation mobility on concentration of lithium dodecylsulphate forming micelles was measured. Several approaches of experimental data treatment were compared and possible simplifications that do not cause loss of precision were considered. Results of the two-detector method showed that thiourea is a suitable EOF marker for BGEs containing dodecylsulfate micelles.

As the two-detector method uses a pressure mobilization of capillary content, its precision can be influenced by reliability and reproducibility of this mobilization. Therefore viscosity measurements were performed using equipment for capillary electrophoresis. Influence of experimental factors and data treatment on determined viscosity was examined. Results showed that even though the capillary electrophoresis instrumentation is not fully suitable for viscosity determination, the inaccuracy will not influence results and precision of the two-detector method.

Dependences of alkaline cations mobilities on lithium dodecylsulfate concentration were measured using thiourea as a suitable EOF marker. Evaluation of experimental results with models used so far provides unrealistic mobilities of complexes of cation with the micelle. It means that such model is not suitable for small inorganic ions. Further studies will be needed to get a better insight to the problem.

# Obsah

Seznam zkratk a symbolů .....	- 7 -
1. Úvod.....	- 12 -
1.1. Kapilární zónová elektroforéza.....	- 12 -
1.2. Micelární systémy .....	- 20 -
1.3. MEKC a interakce látek s micelami.....	- 24 -
2. Cíle práce.....	- 31 -
3. Experimentální část.....	- 32 -
3.1. Použité chemikálie .....	- 32 -
3.2. Instrumentace.....	- 32 -
3.3. Zpracování dat .....	- 33 -
3.4. Experimentální podmínky .....	- 33 -
3.4.1. Dvoudetektorová metoda.....	- 34 -
3.4.2. Stanovování viskozity pomocí instrumentace pro kapilární elektroforézu .....	- 38 -
3.4.3. Závislost mobility alkalických kationtů na koncentraci LiDS.....	- 40 -
4. Výsledky a diskuse.....	- 43 -
4.1. Dvoudetektorová metoda.....	- 43 -
4.2. Stanovování viskozity pomocí instrumentace pro kapilární elektroforézu .....	- 62 -
4.3. Závislost mobility alkalických kationtů na koncentraci LiDS .....	- 67 -
5. Závěr .....	- 75 -
Literatura .....	- 77 -

## Seznam zkratk a symbolů

A	analyt
$a$	nejkratší vzdálenost, na kterou se iont a protiiont mohou přiblížit
$a_A$	aktivita analytu
$a_C$	aktivita komplex analytu a ligandu
$a_L$	aktivita ligandu (interagující složky základního elektrolytu)
$A_{spike}$	plocha artefaktu, který na záznamu tlaku doprovází výměnu vialky na začátku kapiláry, ale není spojen se skutečnou aplikací tlaku na kapiláru
$\alpha$	frakční náboj micely
$b_A$	molární odezva vodivostní detekce ( <i>molar conductivity detection response</i> )
$b_{cor}$	konstanta pro přepočet proudu udávaného přístrojem pro kapilární elektroforézu na korigovaný proud
BGE	základní elektrolyt ( <i>background electrolyte</i> )
$\beta$	poměr počtu protiiontů vázaných k micelle ku agregačnímu číslu ( <i>counterion binding parameter</i> )
C	komplex analytu a ligandu (interagující složky základního elektrolytu)
$c$	molární koncentrace
$c^*$	kritická micelární koncentrace
$c_A$	celková (analytická) koncentrace analytu
$c_{A,i}$	rovnovážná koncentrace i-té formy analytu
$c_{BGE,i}$	koncentrace i-té složky základního elektrolytu
$c_{det}$	analytická koncentrace detergentu
$c_{DS}$	koncentrace dodecylsulfátu
$c_{DS,M}$	koncentrace dodecylsulfátu zapojeného do micel
$c_i$	molární koncentrace i-tého iontu
$c_L$	koncentraci ligandu (interagující složky základního elektrolytu)
$c_{L,max}$	nejvyšší použitá koncentrace ligandu (interagující složky základního elektrolytu)
$c_M$	koncentrace micel
CCD	bezkontaktní vodivostní detektor ( <i>contactless conductivity detector</i> )
CMC	kritická micelární koncentrace ( <i>critical micelle concentration</i> )
CMC <sub>2</sub>	druhá kritická micelární koncentrace – kritická koncentrace spojená se změnou tvaru micel ze sférického na tyčinkový ( <i>sphere-to-rod transition</i> )
$d$	rozdíl mezi vzdáleností od vodivostního detektoru k UV detektoru a vzdáleností od začátku kapiláry k vodivostnímu detektoru
$d_{kap}$	vnitřní průměr kapiláry
DAD	detektor s diodovým polem ( <i>diod array detector</i> )

$DS^-$	dodecylsulfát ( <i>dodecyle sulfate</i> )
$\delta$	stínící faktor pro náboj micely
$\Delta L$	vzdálenost, na kterou je protlačen obsah kapiláry
$\Delta t$	časový interval, po který je na kapiláru aplikován tlak
$E$	intenzita elektrického pole
$E_{het,M}$	intenzita elektrického pole v zóně základního elektrolytu s interagující složkou
EF	základní elektrolyt bez micel
EF <sub>1</sub>	zóna základního elektrolytu bez micel vtlačena do kapiláry ve fázi 3 dvoudetektorové metody
EF <sub>2</sub>	zóna základního elektrolytu bez micel vtlačena do kapiláry ve fázi 5 dvoudetektorové metody
EKC	elektrokinetická chromatografie ( <i>electrokinetic chromatography</i> )
EM	základní elektrolyt obsahující micely
EM <sub>1</sub>	zóna základního elektrolytu obsahujícího micely vtlačena do kapiláry ve fázi 2 dvoudetektorové metody
EM <sub>2</sub>	zóna základního elektrolytu obsahujícího micely vtlačena do kapiláry ve fázi 6 dvoudetektorové metody
EOF	elektroosmotický tok ( <i>electroosmotic flow</i> )
$\varepsilon$	permitivita roztoku
$F$	Faradayova konstanta
$\gamma$	konstanta v závislosti agregačního čísla na koncentraci volného protiiontu micely
HVL	Haarhoffova – Van der Lindeho funkce
$\eta$	dynamická viskozita roztoku
$\eta_0$	viskozita referenčního základního elektrolytu
$\eta_C$	viskozita základního elektrolytu obsahujícího látku ovlivňující viskozitu
$I$	iontová síla
$I_0$	proud procházející referenčním základním elektrolytem
$I_C$	proud procházející základním elektrolytem, jehož viskozita je korigována
$I_{cor}$	korigovaný proud procházející kapilárou
$I_{het}$	proud procházející nehomogenně naplněnou kapilárou
$I_{het,inst}$	nekorigovaný proud procházející nehomogenně naplněnou kapilárou
$I_{hom}$	proud procházející homogenně naplněnou kapilárou
$I_{inst}$	hodnota proudu procházejícího kapilárou při daném napětí udávaná přístrojem pro kapilární elektroforézu
$I_{met}$	hodnota proudu procházejícího kapilárou při daném napětí změřená připojeným multimetrem
$j$	proudová hustota



$K$	rovnovážná konstanta interakce analytu a ligandu
$k$	retenční faktor
$K'$	zdánlivá konstanta interakce analytu a ligandu
$K_{ag}$	konstanta v závislosti agregačního čísla na koncentraci volného protiiontu micely
$\kappa$	vodivost
$\kappa_M$	vodivost základního elektrolytu
$\kappa_M^{inst}$	vodivost základního elektrolytu vypočtená s použitím nekorigovaného proudu
$L$	ligand (interagující složka základního elektrolytu)
$L_0$	vzdálenost od začátku kapiláry k vodivostnímu detektoru
$L_D$	vzdálenost mezi vodivostním a UV detektorem
$L_d$	vzdálenost od začátku kapiláry k detektoru
$L_{inj}$	vzdálenost o kterou se ve fázi 4 dvoudetektorové metody vzájemná vzdálenost zóny vzorku a zóny markeru liší od vzdálenosti mezi začátkem kapiláry a vodivostním detektorem
$L_{mig}$	vzdálenost, kterou analyt urazil migračním pohybem
$L_{pik}$	vzdálenost o kterou se ve fázi 8 dvoudetektorové metody vzájemná vzdálenost zóny vzorku a zóny markeru liší od vzdálenosti mezi vodivostním a UV detektorem
$L_T$	celková délka kapiláry
$L_{UV}$	vzdálenost od začátku kapiláry k UV detektoru
$M$	mobilitní poměr ( <i>mobility ratio</i> )
$M^+$	protiiont detergentu
MEKC	micelární elektrokinetická chromatografie ( <i>micellar electrokinetic chromatography</i> )
MOPS	morfolinopropansulfonová kyselina
$N_A$	Avogadrova konstanta
$N_{ag}$	agregační číslo
$n_{aq}$	látkových množství analytu ve vodné fázi
$n_{mic}$	látkových množství analytu v micelární fázi
$\nu$	viskozitní poměr
$P$	partiční koeficient (distribuční konstanta)
$p$	tlak aplikovaný na kapiláru
$p_{inj,M}$	tlak zadaný do ovládacího programu elektroforézy, který má být aplikován na kapiláru během dávkování zóny markeru při měření dvoudetektorovou metodou
$p_{inst}$	tlak zadaný do ovládacího programu elektroforézy, který má být aplikován na kapiláru během měření dvoudetektorovou metodou
$q$	arbitrárně stanovené číslo mnohem menší než jedna (ve výpočtu odhadu mobility komplexu sodného kationtu s micelou)
$R$	univerzální plynová konstanta

$R^-$	jednosytný anionický detetergent
$R^2$	koeficient determinace
$S$	průřez kapiláry
$S_A$	relativní směrnice rychlosti analytu ( <i>relative velocity slope</i> )
SDS	dodecylsulfát sodný ( <i>sodium dodecyle sulfat</i> )
$T$	termodynamická teplota
$t$	čas
$t_A$	migrační čas analytu
$t_{A,G}$	čas, kdy je vzorek zaznamenán vodivostním detektorem
$t_{A,UV}$	čas, kdy je zóna analytu zaznamenána UV detektorem
$t_{EOF}$	„migrační čas“ EOF markeru
$t_G$	čas, kdy je vzorek zaznamenán UV detektorem
$t_{M,G}$	čas, kdy je zóna markeru zaznamenána vodivostním detektorem
$t_{M,in1}$	čas, kdy se začíná dávkovat zóna markeru
$t_{M,in2}$	čas, kdy skončí dávkování zóny markeru
$t_{M,UV}$	čas, kdy je zóna markeru zaznamenána UV detektorem
$t_{v,0}$	„migrační čas“ viskozitního markeru v referenčním základním elektrolytu
$t_{v,C}$	„migrační čas“ viskozitního markeru v základním elektrolytu, jehož viskozita je korigována
$t_{p1}$	začátek aplikace tlaku (při měření viskozity)
$t_{p2}$	konec aplikace tlaku (při měření viskozity)
$t_{thr1}$	čas, kdy se na kapiláru přestane aplikovat tlak před výměnou vialky na začátku kapiláry a nadávkováním zóny markeru
$t_{thr2}$	čas, kdy se po nadávkování zóny markeru a výměně vialky na začátku kapiláry opět začne na kapiláru aplikovat tlak
$t_U$	doba, po kterou bylo na kapiláru vloženo napětí
$t_{U1}$	začátek časového intervalu, kdy je na kapiláru vloženo napětí
$t_{U2}$	konec časového intervalu, kdy je na kapiláru vloženo napětí
$t_{UV}$	čas, kdy je vzorek zaznamenán UV detektorem
$TR_i$	veličina, jíž je úměrná citlivost nepřímé detekce ( <i>transfer ratio</i> ) pro i-tou složku základního elektrolytu
$U$	napětí
$u_a$	aktuální mobilita iontu při dané iontové síle
$u_{app}$	zjevná mobilita analytu
$u_C$	mobilita komplexu analytu s micelou
$u_{eff}$	efektivní elektroforetická pohyblivost (efektivní mobilita)
$u_{eff}^v$	efektivní mobilita korigovaná na viskozitu

$u_{EOF}$	mobilita elektroosmotického toku
$u_f$	efektivní mobilita volného analytu
$u_i$	aktuální mobilita i-té formy analytu při dané iontové síle
$u_{lim}$	limitní mobilita (pohyblivosti iontu při nekonečném zředění)
$u_{lim}'$	limitní mobilita protiiontu
UV	ultrafialová oblast spektra ( <i>ultraviolet</i> )
$V_{aq}$	objem vodné fáze
$V_{mic}$	objem micelární fáze
$\bar{v}$	parciální molární objem detergentu
$v_A$	aktuální rychlost pohybu analytu při dané koncentraci analytu
$v_{app}$	zjevná rychlost pohybu analytu kapilárou
$v_{p,pt}$	rychlost protlačování formulovaná vzhledem k integrálu časového záznamu průběhu tlaku
$v_{p,t}$	rychlost protlačování formulovaná vzhledem k časovému intervalu
VIS	viditelná oblast spektra ( <i>visual</i> )
$x_{aq}$	molární zlomek volné formy analytu
$x_i$	molární zlomek i-té formy analytu
$x_{mic}$	molární zlomek analytu vázaného v micle
$z$	nábojové číslo
$z'$	nábojové číslo protiiontu
$z_i$	nábojové číslo i-tého iontu

# 1. Úvod

Kapilární elektroforéza je široce využívaná analytická separační metoda. Kromě zónové elektroforézy a izotachforézy patří mezi její módy i kapilární elektrochromatografie, která pro separaci využívá jak elektroforetické, tak chromatografické principy. Jednou z variant kapilární elektrochromatografie je micelární elektrokinetická chromatografie, která dosahuje separace na základě rozdílné distribuce analytů mezi fází roztoku a micelární pseudofází.

Při měření elektroforetických pohyblivostí v základních elektrolytech obsahujících nabitě interagující složky (například micely) může být problémem správné stanovení rychlosti elektroosmotického toku. Přestože se takové interagující systémy stále více využívají, otázka správného stanovení elektroosmotického toku není dosud jednoznačně vyřešena.

Přítomnost micel v základním elektrolytu ovlivňuje nejen mobility látek, které se inkorporují do hydrofobní části micely, ale i mobility malých anorganických iontů. Tyto interakce nebyly dosud dostatečně popsány, ačkoli na základě jejich znalosti by bylo možné například lépe předpovídat chování základních elektrolytů obsahujících micely.

## 1.1. Kapilární zónová elektroforéza

### *Efektivní elektroforetická pohyblivost*

V kapilární zónové elektroforéze probíhá separace v prostředí základního elektrolytu (BGE – *background electrolyte*) o vhodných vlastnostech (pH, vodivost, pufrací kapacita). Úzká zóna vzorku se nadávkuje na začátek kapiláry (zpravidla hydrodynamicky – aplikací tlaku, nebo elektrokineticky – vložením napětí). Poté se na konce kapiláry vloží vysoké napětí, které uvnitř kapiláry vytvoří elektrické pole. Jeho intenzita  $E$  je dána podílem vloženého napětí  $U$  a celkové délky kapiláry  $L_T$ .

Nabitý analyt v důsledku přítomnosti elektrického pole migruje roztokem rychlostí úměrnou intenzitě  $E$ , přičemž konstanta této úměrnosti  $u_{eff}$  se označuje jako efektivní elektroforetická pohyblivost (efektivní mobilita) a je charakteristická pro daný analyt ve zvoleném BGE. Celková rychlost pohybu analytu kapilárou  $v_{app}$  je pak dána součtem jeho migrační rychlosti a rychlosti elektroosmotického toku (EOF – *electroosmotic flow*). Elektroosmotický tok je pohyb celého obsahu kapiláry směrem k jedné z elektrod (v případě nemodifikované křemenné kapiláry ke katodě), vznikající působením elektrického pole na difúzní část elektrické dvojvrstvy na vnitřním povrchu kapiláry [1]. Jeho rychlost je také

úměrná intenzitě elektrického pole s konstantou úměrnosti  $u_{EOF}$  – mobilitou elektroosmotického toku.

Pro celkovou rychlost pohybu analytu v kapiláře tedy platí:

$$v_{app} = (u_{eff} + u_{EOF}) \cdot E = (u_{eff} + u_{EOF}) \frac{U}{L_T} \quad (1)$$

Při vhodné volbě BGE se efektivní pohyblivosti jednotlivých analytů od sebe liší a dojde k rozdělení nabitých látek obsažených ve vzorku na samostatné zóny, přičemž kationty migrují ke katodě a jejich efektivní mobilita je kladná, zatímco anionty migrují se zápornou efektivní mobilitou k anodě. Neutrální látky nelze v tomto módu kapilární elektroforézy rozdělit, všechny se pohybují rychlostí EOF a mohou tedy sloužit ke stanovení této rychlosti – jako *EOF markery*. Rychlost EOF v křemenné kapiláře je závislá na pH BGE a může fluktuovat. Stabilní EOF je možné zajistit nekovalentním pokrytím vnitřního povrchu kapiláry [2]. Tímto způsobem lze dosáhnout i změny rychlosti případně směru EOF.

Před koncem kapiláry je umístěn vhodný detektor, který zaznamená průchod jednotlivých zón analytů. Pro daný analyt je pak možné stanovit jeho efektivní mobilitu  $u_{eff}$  podle rovnice:

$$u_{eff} = \frac{L_T \cdot L_d}{U \cdot t_A} - u_{EOF} = \frac{L_T \cdot L_d}{U} \cdot \left( \frac{1}{t_A} - \frac{1}{t_{EOF}} \right) \quad (2)$$

kde  $L_d$  je vzdálenost detektoru od začátku kapiláry,  $t_A$  je migrační čas příslušného analytu a  $t_{EOF}$  „migrační čas“ EOF markeru. Migrační časy se odečtou jako polohy píků na elektroferogramu (záznamu odezvy detektoru v závislosti na separačním čase) [3].

V tomto kontextu se efektivní mobilitou rozumí pohyblivost analytu při dané iontové síle a hodnotě pH. Pokud se analyt vyskytuje v roztoku v různých formách, mezi kterými se ustavuje rychlá rovnováha, je efektivní mobilita, popsaná rovnicí (2), váženým průměrem aktuálních mobilit všech těchto forem:

$$u_{eff} = \sum_i x_i u_i = \frac{\sum_i c_{A,i} u_i}{\sum_i c_{A,i}} = \frac{\sum_i c_{A,i} u_i}{c_A} \quad (3)$$

kde  $u_i$  je aktuální mobilita dané formy analytu (pokud je některá z forem analytu neutrální, je její mobilita rovna nule),  $x_i$  je její molární zlomek,  $c_{A,i}$  její koncentrace,  $c_A$  je celková

(analytická) koncentrace analytu. Aktuální mobilitou se rozumí pohyblivost iontu při daných fyzikálních podmínkách, zejména iontové síle, viskozitě a teplotě.

Analyt se může vyskytovat v různých formách například z důvodu ustavování acidobazických rovnováh (pro slabé nebo vícesytné kyseliny a zásady nebo amfolyty) [4] nebo komplexačních rovnováh, pokud dochází k interakci analytu s některou složkou BGE [5].

#### *Nepřímá detekce*

Pokud analyt obsahuje vhodný chromofor, je možné jeho zónu registrovat pomocí absorpčního detektoru. Jestliže ale analyt nemá vhodnou funkční skupinu, nelze ho tímto způsobem detekovat přímo, je ale možné využít detekci nepřímou.

Pokud alespoň jedna složka BGE vyvolává odezvu detektoru (například absorbuje při vhodné vlnové délce), pak je průchod zóny neabsorbujícího analytu detektorem zpravidla provázen poklesem signálu detektoru a projeví se na elektroferogramu jako negativní pík. To je způsobeno faktem, že v zóně analytu je koncentrace složek BGE obvykle nižší ve srovnání s původním, neporušeným složením základního elektrolytu.

Citlivost nepřímé detekce je úměrná veličině  $TR_i$  (*transfer ratio*), což je změna koncentrace  $i$ -té složky BGE  $c_{BGE,i}$  vztažená na jednotkovou změnu koncentrace daného analytu  $c_A$  [6]:

$$TR_i = \frac{\partial c_{BGE,i}}{\partial c_A} \quad (4)$$

#### *Vodivostní detekce*

Vodivost zóny analytu se obvykle liší od vodivosti neporušeného BGE, což umožňuje detekovat zónu analytu pomocí vodivostní detekce. Mírou citlivosti pro daný analyt je molární odezva vodivostní detekce (*molar conductivity detection response*)  $b_A$  popsána rovnicí:

$$b_A = \frac{\partial \kappa}{\partial c_A} \quad (5)$$

kde  $\kappa$  je vodivost a  $c_A$  koncentrace analytu [6].

V této práci byl používán vysokofrekvenční bezkontaktní vodivostní detektor (CCD – *contactless conductivity detector*) vyvinutý v naší laboratoři [7]. Základem detektoru jsou dvě

válcové elektrody, kterými prochází kapilára. Část kapiláry mezi těmito elektrodami je detekčním místem detektoru. Na jednu z elektrod je vkládáno vysokofrekvenční napětí. Signál z této elektrody je kapacitou stěny kapiláry přenášen do roztoku, prochází roztokem a teče do druhé přijímací elektrody. Vysokofrekvenční proud je úměrný vodivosti roztoku v prostoru mezi elektrodami. Po dalším zpracování je výstupem detektoru stejnosměrný napěťový signál, který je funkcí vodivosti roztoku v detekčním místě.

### *Elektromigrační disperze*

Rychlost pohybu analytu  $v_A$  obecně závisí na aktuální koncentraci analytu  $c_A$ . V důsledku toho dochází k jevu zvanému *elektromigrační disperze*, který se projevuje deformací píku analytu z gaussovského tvaru do tvaru trojúhelníkového. Elektromigrační disperze je rušivý fenomén, který může významně přispívat k rozšiřování zón analytů, což snižuje účinnost separace a komplikuje stanovení přesné hodnoty efektivní mobility analytu.

Tendence píku analytu deformovat se elektromigrační disperzí je charakterizována *relativní směrnici rychlosti*  $S_A$  (*relative velocity slope*):

$$S_A = \frac{\kappa}{v_A} \frac{\partial v_A}{\partial c_A} \quad (6)$$

Velikost směrnice relativní rychlosti pro daný analyt závisí na složení základního elektrolytu a vhodnou volbou BGE tedy lze elektromigrační disperzi eliminovat, nebo alespoň významně snížit [6].

### *Vliv iontové síly*

V roztocích elektrolytů se kolem každého iontu nachází *iontová atmosféra* – sférická oblast, kde v časovém průměru převažují ionty opačného znaménka (protiionty) nad ionty znaménka stejného jako centrální iont – a v důsledku toho dochází ke snížení energie centrálního iontu [8].

Při pohybu iontu v elektrickém poli ovlivňuje iontová atmosféra jeho migrační vlastnosti, takže aktuální mobilita iontu  $u_a$  se liší od jeho limitní mobility  $u_{\text{lim}}$  (pohyblivosti iontu při nekonečném zředění). Vliv iontové atmosféry lze kvantifikovat na základě znalosti *iontové síly* roztoku  $I$ , která charakterizuje celkovou iontovou koncentraci a současně zohledňuje mocenství iontů. Je definována vztahem:

$$I = \frac{1}{2} \sum_i c_i z_i^2 \quad (7)$$

kde  $c_i$  je koncentrace příslušného iontu v roztoku a  $z_i$  je jeho nábojové číslo [9].

Závislost aktuální mobility na iontové síle pak popisuje Onsagerův vztah:

$$u_a = u_{\text{lim}} - \left( u_{\text{lim}} B_1 |z \cdot z'| \frac{q}{1 + \sqrt{q}} + |z| B_2 \right) \frac{\sqrt{I}}{1 + Ba\sqrt{I}} \quad (8)$$

$$B_1 = \frac{\sqrt{2}F^3}{12\pi \cdot N_A (\varepsilon RT)^{\frac{3}{2}}} \quad B_2 = \frac{\sqrt{2}F^2}{6\pi \cdot N_A \eta (\varepsilon RT)^{\frac{1}{2}}} \quad B = \frac{\sqrt{2}F}{(\varepsilon RT)^{\frac{1}{2}}} \quad q = \frac{|z \cdot z'|}{|z| + |z'|} \frac{|u_{\text{lim}}| + |u_{\text{lim}}'|}{|z \cdot u_{\text{lim}}| + |z' \cdot u_{\text{lim}}'|}$$

kde  $u_a$  je aktuální mobilita sledovaného iontu v roztoku o iontové síle  $I$ ;  $u_{\text{lim}}$  je jeho limitní mobilita a  $z$  jeho nábojové číslo;  $u_{\text{lim}}'$  a  $z'$  jsou limitní mobilita a nábojové číslo příslušného protiiontu;  $a$  odpovídá nejkratší vzdálenosti, na kterou se iont a protiiont mohou přiblížit;  $F$  je Faradayova konstanta;  $N_A$  Avogadrova konstanta;  $R$  univerzální plynová konstanta;  $\varepsilon$  permitivita a  $\eta$  dynamická viskozita roztoku;  $T$  je termodynamická teplota [10].

Tento model zohledňuje nenulovou velikost iontů (ačkoli hodnota parametru  $a$  je pro konkrétní iont často obtížně dostupná) a dobře popisuje systémy do iontové síly přibližně 75 mM [10, 11]. Byl ale navržen pro popis vodivosti roztoků silných binárních elektrolytů a bere do úvahy pouze protiiont analytu, zatímco v kapilární elektroforéze obsahují základní elektrolyty obvykle více druhů iontů a pohyblivost libovolného iontu je pak do určité míry ovlivněna všemi jeho partnery v roztoku.

Onsager a Fuoss [12] vypracovali teorii popisující difúzi, viskozitu a vodivost roztoků elektrolytů libovolného složení (jejíž platnost je ovšem stále omezená podmínkou, že celková koncentrace iontů musí být nízká). Na jejím základě Jaroš *et al.* [13] zformulovali rovnici popisující aktuální pohyblivost iontu v BGE, která je analogická rovnici (8), ale zohledňuje všechny druhy iontů přítomné v roztoku, ne pouze protiiont.

Tento model poskytuje přesnější výsledky ve srovnání s Onsagerovým modelem (8), především pokud BGE obsahuje ionty, jejichž limitní mobility se výrazně liší od limitní mobility iontu analyzovaného, což platí především pro kyselé nebo zásadité BGE s významnými koncentracemi velmi pohyblivých hydroxoniových kationtů respektive hydroxidových aniontů [10]. Výpočet pomocí tohoto modelu je ale komplikovaný a vyžaduje použití softwarových nástrojů.



Jelikož jsou iontovou silou BGE ovlivněny aktuální mobility iontů a tedy i efektivní mobility analytů, je žádoucí provádět měření efektivních pohyblivostí na jejichž základě jsou stanovovány fyzikálně chemické konstanty (limitní pohyblivosti iontů, rovnovážné disociační nebo komplexační konstanty) v základních elektrolytech o konstantní a známé iontové síle.

#### *Vliv viskozity*

Změna viskozity BGE vede ke změně mobilit jak analytů tak EOF. V případě, že viskozity BGE použitých v sérii měření se od sebe významně liší (zejména pokud BGE obsahují různé koncentrace látky silně ovlivňující viskozitu, jako jsou například cyklodextriny), je třeba hodnoty efektivních mobilit korigovat. Existuje řada přístupů jak tuto korekci provést [14].

Jednou z možností je stanovení viskozit v samostatných experimentech (například pomocí viskozimetru) a korigovanou efektivní mobilitu  $u_{eff}^v$  určit pomocí takzvaného *viskozitního poměru*  $\nu$ :

$$u_{eff}^v = u_{eff} \frac{\eta_C}{\eta_0} = u_{eff} \cdot \nu \quad (9)$$

kde  $u_{eff}$  je efektivní pohyblivost určená podle rovnice (2),  $\eta_C$  je viskozita BGE, v němž byla stanovena pohyblivost  $u_{eff}$ ,  $\eta_0$  je viskozita referenčního BGE (zpravidla roztok neobsahující látku významně ovlivňující viskozitu) [15, 16].

Hodnotu viskozitního poměru někteří autoři určují i přímo z elektroforetických experimentů, buď jako poměr proudů [17], nebo poměr „migračních časů“ viskozitních markerů [16], jak je uvedeno v rovnici (10):

$$\nu = \frac{\eta_C}{\eta_0} = \frac{I_0}{I_C} = \frac{t_{v,C}}{t_{v,0}} \quad (10)$$

kde  $I_C$  a  $t_{v,C}$  jsou procházející proud respektive migrační čas viskozitního markeru v BGE v němž byla stanovena korigovaná mobilita,  $I_0$  a  $t_{v,0}$  jsou procházející proud a migrační čas viskozitního markeru v referenčním BGE. Použití viskozitního markeru je problematické – jedná se o neutrální látku (tedy v podstatě o EOF marker), která nesmí interagovat s žádnou složkou BGE, a nalezení takové látky (zejména pokud BGE obsahuje micely) nemusí být jednoduché. Tento přístup také předpokládá, že změna rychlosti EOF je dána pouze změnou viskozity BGE.

Dalším přístupem je používání mobilitních poměrů (*mobility ratio*) namísto efektivních mobilit. Mobilitní poměr  $M$  je definován rovnicí (11) a jeho hodnota by měla být nezávislá na faktorech jako je aplikované napětí, délka kapiláry nebo viskozita BGE [18]

$$M = \frac{u_{eff} + u_{EOF}}{u_{EOF}} = \frac{u_{app}}{u_{EOF}} \quad (11)$$

kde  $u_{app}$  je zjevná mobilita,  $u_{eff}$  a  $u_{EOF}$  mají stejný význam jako v rovnici (1).

### *Systémové mobility*

Nadávkováním zóny vzorku se poruší jinak homogenní složení BGE v kapiláře, což vede k vytvoření *systémových zón* během elektroforetické separace. Systémové zóny jsou disturbance, které se pohybují kapilárou (působením EOF případně i vlastní mobilitou) a při průchodu detektorem mohou vyvolat odezvu, která neodpovídá žádnému analytu a označuje se jako *systémový pík*. Systémové píky mohou být zaznamenány, pouze pokud detektor reaguje na koncentraci alespoň jedné složky BGE, tedy především v případě vodivostní nebo nepřímé UV detekce [19].

Mobilita systémové zóny se označuje jako *eigenmobilita* a počet eigenmobilit pro daný BGE je roven počtu jeho složek (složkou se rozumí kyselina, báze nebo amfolyt libovolné sytnosti) [20].

Systémové píky jsou rušivý fenomén, protože komplikují interpretaci výsledného elektroferogramu, mohou být například zaměněny s píkem některého analytu, nebo s píkem analytu interagovat a ztížit nebo znemožnit vyhodnocení [21]. Mohou být ale také využity k určení rychlosti EOF nebo, speciálně v micelárních systémech, ke stanovení kritické micelární koncentrace (CMC – viz níže) [22].

Z linearizovaného modelu elektromigrace (viz *Program PeakMaster* níže) pro BGE složené ze slabých univalentních elektrolytů vyplývá, že dvě eigenmobility jsou spjaté s přítomností hydroxóniových a hydroxidových iontů a v principu není ani jedna zcela nulová. Nicméně v dobře pufovaných základních elektrolytech o pH v oblasti přibližně 5 až 9 jsou absolutní hodnoty těchto eigenmobilit tak malé, že se obě zóny překrývají a na detektoru se projeví jako jeden systémový pík s přibližně nulovou eigenmobilitou, který může být použit k určení rychlosti EOF. Ve spíše kyselých respektive alkalických BGE jedna z těchto eigenmobilit roste (v absolutní hodnotě), zatímco druhá se blíží k nule [23].

Lze nalézt takové BGE (například sodno-oxalátový nebo imidazol-oxalátový pufr), ve kterých není ani jedna eigenmobilita blízká nule [21].

### *Simulační programy*

Výběr BGE vhodného pro separaci dané skupiny analytů může být časově, materiálně i finančně náročný. Protože separace kapilární elektroforézou se provádí v homogenním roztoku v kapiláře o jednoduché geometrii, lze v principu její průběh kompletně popsat matematickým modelem zahrnujícím rovnice acidobazických rovnováh a rovnice kontinuity. Takový model je v principu nelineární a je téměř nemožné nalézt jeho analytické řešení. S využitím výpočetní techniky jej ale lze řešit numericky (simulační program Simul 5) nebo na základě aproximativní linearizace (program PeakMaster).

Použití takových programů může značně zjednodušit volbu BGE – klasický postup „pokus-omyl“ lze omezit na simulace, kdy uživatel interaktivně mění parametry experimentu a pouze systémy vhodné podle simulací pak otestuje v praxi. Tyto programy ale také umožňují bližší zkoumání procesů provázejících elektromigraci [6].

### *Simulační program Simul 5*

Dynamický simulační program Simul 5 vyvinutý v naší pracovní skupině [24] řeší rovnice popisující dynamiku elektromigrace numericky. Vstupními parametry jsou složení BGE a zóny vzorku, vlastnosti složek BGE a analytů (limitní mobility a disociační konstanty), experimentální uspořádání (délka kapiláry, pozice detektoru, délka a počáteční pozice zóny vzorku, aplikované napětí, mobilita EOF). Na jejich základě program poskytuje časový vývoj koncentračních profilů všech látek v systému (analytů i složek BGE), časový vývoj vodivostního profilu a profilu pH, simuluje také záznam odezvy detektoru (elektroferogram).

Simul 5 umožňuje i zohlednění vlivu iontové síly. V tom případě jsou v každém výpočetním kroku hodnoty limitních mobilit korigovány podle Onsagerovy-Fuossovy teorie a koncentrace převedeny na aktivity podle rozšířeného Debye-Hückelova zákona s lineárním členem.

Pomocí Simulu 5 lze studovat jevy spojené s elektromigrační separací (například elektromigrační disperzi, chování systémových zón), je ale náročný na výpočetní čas a na zkušenosti uživatele.

### Program PeakMaster

Za předpokladu, že koncentrace analytů separovaných kapilární elektroforézou jsou ve srovnání s koncentracemi složek BGE velmi malé, je možné rovnice popisující dynamiku elektromigrace linearizovat. Na tomto linearizovaném modelu je založen program PeakMaster vyvinutý v naší pracovní skupině [6, 21].

Pro zvolené složení BGE, separované analyty a experimentální podmínky (vstupní parametry obdobné jako v případě programu Simul 5) poskytuje PeakMaster vlastnosti BGE (pH, iontovou sílu, vodivost a pufrační kapacitu, zastoupení jednotlivých forem složek BGE), dále hodnoty eigenmobilit a efektivní mobility jednotlivých analytů, relativní směrnice rychlosti analytu (je mírou elektromigrační disperze, (6)), hodnotu  $TR_i$  (míra citlivosti nepřímé detekce, (4)) a molární odezvy vodivostní detekce (5). Výstupem je také simulovaný elektroferogram znázorňující pozice a tvary píků analytů a pozice systémových píků.

PeakMaster také umožňuje zohlednit vliv iontové síly obdobně jako Simul 5.

## 1.2. Micelární systémy

### Micely

Molekuly látek označovaných jako *detergenty* se skládají ze dvou částí rozdílného charakteru: polární hydrofilní „hlavy“ (může být anionická, kationická, zwitterionická nebo nenabitá) a nepolárního hydrofobního (zpravidla uhlovodíkového) „ocasů“. Ve vodných roztocích při překročení určité teploty (takzvaná *Kraftova teplota*) a je-li koncentrace detergentu vyšší než kritická micelární koncentrace (CMC – *critical micelle concentration*), se molekuly detergentu shlukují a vytvářejí přibližně sférické agregáty koloidních rozměrů označované jako *micely*.

„Ocasy“ molekul detergentu jsou orientovány do středu micely, zatímco „hlavy“ tvoří polární povrch agregátu. Micely jsou dynamické útvary a neustále vyměňují jednotlivé molekuly detergentu (běžně označované jako *monomery*) s vodným roztokem [3, 8]. Počet molekul monomeru tvořících jednu micelu se nazývá *agregační číslo*.

Micelizace je výsledkem dvou proti sobě působících sil. Hydrofobní interakce mezi „ocasy“ podporuje agregaci, zatímco sterické, případně elektrostatické odpuzování „hlav“ omezuje velikost micely [25].

Pro jednosytný anionický detergent  $R^-$  s protiiontem  $M^+$  lze micelizaci popsat rovnicí:

$$N_{ag} R^- + (N_{ag} \beta) M^+ \rightleftharpoons R_{N_{ag}} M_{(N_{ag} \beta)}^{-(N_{ag} (1-\beta))} \quad (12)$$

kde  $N_{ag}$  je agregační číslo a  $\beta$  je poměr počtu protiiontů vázaných k micely ku agregačnímu číslu (*counterion binding parameter*) [26].

Dalším parametrem charakterizujícím micely je *frakční náboj*  $\alpha$  – náboj micely vydělený agregačním číslem. V roztoku bez přidaného elektrolytu pro frakční náboj platí:

$$\alpha = 1 - \beta \quad (13)$$

Jednou z nejprostudovanějších látek tvořících micely je dodecylsulfát sodný (SDS), využívají se ale i soli dodecylsulfátu s jinými protiionty. Následující část je zaměřena především na vlastnosti dodecylsulfátových micel.

#### *Kritická micelární koncentrace*

CMC je nejnižší koncentrace detergentu, při které se v roztoku objeví micely. Překročení CMC je doprovázeno změnou některých fyzikálních vlastností roztoku, nicméně se často nejedná o prudkou změnu, spíše o pozvolný přechod v určitém rozsahu koncentrací [8] a proto se někdy mluví o CMC spíše jako o koncentračním intervalu.

Ke stanovení CMC se používá řada metod založených například na měření povrchového napětí, vodivosti, rozptylu světla, dále se využívá spektrofotometrie (se solubilizací barviva v micely), potenciometrie [22], nebo isothermální titrační kalorimetrie [27].

CMC lze stanovovat i pomocí kapilární elektroforézy. Pomocí instrumentace pro kapilární elektroforézu lze provést klasické konduktometrické stanovení CMC [28].

Závislost efektivní mobility látky (solutu), která se inkorporuje do micel, na koncentraci detergentu vykazuje prudkou změnu při překročení CMC [29]. Nicméně Lin *et al* [30] uvádí, že se hodnoty CMC stanovené touto metodou při použití kationických solutů v závislosti na použitém solutu liší.

Metoda založená na lineární závislosti retenčního faktoru solutu na koncentraci micel v BGE určuje CMC ze směrnice a úseku této závislosti (retenční faktor bude definován dále, viz *Chromatografický přístup* v kapitole 1.3). Výsledky této metody mohou být nepřesné (udávají nižší hodnotu CMC ve srovnání s jinými metodami), pokud solut interaguje i s volným detergentem [30].

CMC lze stanovit i ze závislosti eigenmobility určitého systémového píku na koncentraci detergentu, která vykazuje skok při překročení CMC [22].

Udávaná hodnota CMC dodecylsulfátu sodného při 25 °C v roztoku, který neobsahuje žádné další látky, je přibližně 8 mM [26, 28, 31, 32, 33].

Závislost CMC nabitých detergentů na teplotě typicky prochází minimem (pro SDS 22,9 °C), ale hodnoty CMC daného detergentu se při různých teplotách liší jen málo (rozdíl CMC maximálně 2 mM pro dodecylsulfáty sodný a lithný v teplotním rozsahu 10 až 60 °C) [27].

Pokud roztok obsahuje kromě látky tvořící micely ještě další elektrolyt, hodnota CMC klesá. To se vysvětluje lepším stíněním náboje polárních „hlav“ molekul detergentu a tedy snížením jejich elektrostatického odpuzování [32, 34].

Velikost snížení CMC závisí nejen na množství, ale i na druhu přidaného elektrolytu. Při dané koncentraci přidaného elektrolytu má hlavní vliv na snížení CMC charakter toho iontu přidané soli, který má náboj stejného znaménka jako protiiont micely (pro dodecylsulfátové micely je to kationt přidaného elektrolytu). Čím silněji interaguje přidaný kationt s micelou, tím účinněji stíní elektrostatickou interakci „hlav“ detergentu a výrazněji snižuje CMC [34]. Vliv iontu o náboji stejného znaménka jako detergent na snížení CMC není zcela jasný. Dutkiewicz a Jakubowska [34] uvádějí, že druh aniontu přidané soli na snížení CMC SDS žádný vliv nemá, zatímco Jacquier a Desbène [32] pozorovali mírné odchylky mezi závislostmi CMC na koncentraci přidané soli pro různé anionty přidané soli.

Je možné definovat také druhou kritickou micelární koncentraci  $CMC_2$  spojenou se změnou tvaru micel ze sférického na tyčinkový (*sphere-to-rod transition*). Romani [33] uvádí hodnotu  $CMC_2$  pro SDS 48 mM, zatímco Bendedouch *et al.* [35] pro dodecylsulfát lithný nepozorovali přechod na tyčinkový tvar micel v rozsahu koncentrací detergentu 8 mM až 1,1 M a do 1,0 M koncentrace přidané soli (LiCl).

#### *Agregační číslo a frakční náboj*

Pro SDS se udávané hodnoty agregačního čísla (v závislosti na použité metodě a podmínkách stanovení) pohybují od 40 do 100, přičemž za nejpravděpodobnější se pokládá hodnota kolem 65 [26]. Z dynamického charakteru micel vyplývá, že nemohou být striktně monodisperzní (v konkrétním roztoku nebudou mít všechny micely stejné agregační číslo), nicméně pro potřebu modelů popisujících vlastnosti micelárních systémů jsou za monodisperzní považovány [26, 31, 36].

Hodnota agregačního čísla pro daný detergent klesá s rostoucí teplotou [31] a roste s koncentrací detergentu. Agregační číslo roste také s koncentrací přidaného elektrolytu

(stejně jako pokles CMC je i tento nárůst agregačního čísla způsoben stíněním coulombické interakce mezi nabitými „hlavami“ molekul detergentu [34]).

Závislost agregačního čísla  $N_{ag}$  pro alkyl-sulfáty sodné na koncentraci volného protiiontu micely  $[M^+]$  popisuje empirický vztah:

$$N_{ag} = K_{ag} [M^+]^\gamma \quad (14)$$

kde  $K_{ag}$  a  $\gamma$  jsou konstanty (pro SDS  $K_{ag} = 162$ ;  $\gamma = 1/4$ ; [36]). Tato závislost platí v intervalu koncentrací CMC až  $CMC_2$ , tedy do změny tvaru micel na tyčinkový [34, 37].

Joshi *et al.* [25] studovali vliv protiiontu ( $Li^+$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Rb^+$ ,  $Cs^+$ ) dodecylsulfátových micel na agregační číslo a frakční náboj. Od  $Li^+$  k  $Cs^+$  rostlo agregační číslo a klesal frakční náboj, což odpovídá rostoucí interakci kationtů s micelou od  $Li^+$  k  $Cs^+$ .

Dutkiewicz a Jakubowska [34] sledovali vliv přidaného elektrolytu na frakční náboj SDS micel. Zjištěné závislosti frakčního náboje na koncentraci přidané soli nebyly monotónní a jejich průběh byl pro různé kationty přidaného elektrolytu různý. Druh aniontu přidané soli měl na frakční náboj dodecylsulfátových micel jen malý vliv. Při odvozování svých závěrů autoři předpokládali, že druh přidaného elektrolytu neovlivňuje hodnotu agregačního čísla.

#### *Iontová síla v micelárních systémech*

Micely s velkým nábojem nepřispívají k iontové síle stejně jako malé neagregované ionty. Burchfield a Woolley [38] při výpočtu iontové síly násobili náboj micely stínícím faktorem  $\delta$ . Jejich experimentálními datům (aktivitní a osmotické koeficienty vodných roztoků nabitých detergentů) dobře vyhovoval model, kdy  $\delta$  mělo libovolnou hodnotu v intervalu 0,4 až 0,7. Iontovou sílu v roztoku detergentu obsahujícím micely popsali následujícím vztahem:

$$I = c^* + \frac{1}{2}(c_{det} - c^*)(1 - \beta) + \frac{1}{2} \frac{(c_{det} - c^*)}{N_{ag}} N_{ag}^2 (1 - \beta)^2 \delta^2 \quad (15)$$

kde  $c_{det}$  je analytická koncentrace detergentu a  $c^*$  je CMC. První člen odpovídá neagregovanému detergentu a jeho protiiontům, druhý volným protiiontům micel a třetí micelám. Vztahy (15) až (17) jsou zformulovány pro jednosytný detergent, jako je například SDS.

Shanks a Franses [26] na základě měření vodivosti vodných roztoků SDS testovali mimo jiné několik modelů popisujících iontovou sílu. Jako nejlepší vyhodnotili model, ve kterém

k iontové síle přispívají pouze neagregované molekuly detergentu, jejich protiionty a volné protiionty micel, které přispívají k iontové síle pouze částečně. Jejich příspěvek je úměrný jejich koncentraci a násobený arbitrárně stanovenou konstantou  $(1 - \beta)$ :

$$I = c^* + \frac{1}{2}(c_{\text{det}} - c^*)(1 - \beta)^2 \quad (16)$$

Další autoři [35, 36] do výpočtu iontové síly zahrnovali neagregované molekuly detergentu, jejich protiionty a volné protiionty micel:

$$I = c^* + \frac{1}{2}(c_{\text{det}} - c^*)(1 - \beta) \quad (17)$$

Program PeakMaster, pomocí kterého byla určována iontová síla BGE použitých v této práci, počítá iontovou sílu tak, jako by v roztoku nedocházelo k agregaci. Příspěvek jednosytného detergentu je pak stejný jako příspěvek silného elektrolytu:

$$I = c_{\text{det}} \quad (18)$$

PeakMaster tak ve srovnání s přístupem Shankse a Fransese [26] (rovnice (15)) příspěvek micel k iontové síle nadhodnocuje a ve srovnání s přístupem Burchfielda a Woolleyho [38] (rovnice (16)) podhodnocuje.

### 1.3. MEKC a interakce látek s micelami

#### *Micelární elektrokinetická chromatografie*

Elektrokinetická chromatografie (EKC – *electrokinetic chromatography*) je módem kapilární elektroforézy. Pro dosažení separace kombinuje princip elektroforetický (migrační pohyb látek roztokem v elektrickém poli) a chromatografický (interakce analytů s aditivou obsaženými v BGE – například s detergenty tvořícími micely nebo s cyklodextriny) [1].

Micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC) je variantou EKC a byla poprvé představena v roce 1984 Terabem *et al.* [39, 40]. Uplatňuje se především v oblastech farmacie a biotechnologie [3]. Lze ji využít jak k separaci neutrálních látek, tak nabitých látek s podobnými mobilitami, které by se obtížně separovaly pomocí zónové elektroforézy.



V MEKC obsahuje BGE nabité (často dodecylsulfátové) micely, označované jako *micelární fáze*, které migrují s vlastní mobilitou. K rozdělení neutrálních analytů pak dochází na základě jejich rozdílné interakce s micelami, čili rozdílné distribuce mezi vodnou fází (pohybující se rychlostí EOF) a micelární pseudofází (pohybující se kombinací elektroosmózy a elektroforetické migrace) [3].

Interakci analytu s micelami lze popsat dvěma ekvivalentními přístupy – chromatografickým a elektroforetickým.

### *Chromatografický přístup*

V MEKC se často používá chromatografický přístup. Pro daný analyt se definuje retenční faktor  $k$  jako poměr látkových množství analytu v micelární fázi  $n_{mic}$  a ve vodné fázi  $n_{aq}$ :

$$k = \frac{n_{mic}}{n_{aq}} = P \frac{V_{mic}}{V_{aq}} = P \frac{\bar{v}(c_{det} - c^*)}{1 - \bar{v}(c_{det} - c^*)} \quad (19)$$

kde  $P$  je partiční koeficient (též distribuční konstanta),  $V_{mic}$  a  $V_{aq}$  jsou objemy micelární respektive vodné fáze,  $\bar{v}$  je parciální molární objem detergentu. Pokud je koncentrace micel nízká, lze jejich objem oproti celkovému objemu roztoku zanedbat a rovnice (19) pak přechází na tvar (20) [40]:

$$k \cong P \cdot \bar{v}(c_{det} - c^*) \quad (20)$$

Pokud jedinými formami analytu v roztoku jsou volný analyt (ve vodné fázi) a analyt vázaný k micelám, je podle rovnice (3) jeho efektivní mobilita  $u_{eff}$  dána vztahem:

$$u_{eff} = x_{aq}u_f + x_{mic}u_C = \frac{n_{aq}}{n_{aq} + n_{mic}}u_f + \frac{n_{mic}}{n_{aq} + n_{mic}}u_C \quad (21)$$

kde  $u_f$  je mobilita volného analytu,  $u_C$  je mobilita komplexu analytu s micelou (ligandem),  $x_{aq}$  a  $x_{mic}$  jsou molární zlomky volné respektive vázané formy analytu. Kombinací rovnic (19) a (21) a následnou úpravou můžeme vyjádřit retenční faktor pomocí mobilit [41]:

$$k = \frac{u_{eff} - u_f}{u_{mic} - u_{eff}} \quad (22)$$

### *Elektroforetický přístup*

Interakci analytu A se složkou BGE – ligandem L, za vzniku komplexu C lze popsat rovnicí (23) a charakterizovat rovnovážnou konstantou  $K$ .



$$K = \frac{a_C}{a_A \cdot a_L} \quad (24)$$

kde  $a_C$ ,  $a_A$  a  $a_L$  jsou aktivity komplexu, volného analytu a ligandu. V praxi se často namísto termodynamické konstanty  $K$  používá zdánlivá konstanta  $K'$ :

$$K' = \frac{[C]}{[A] \cdot [L]} \quad (25)$$

kde  $[C]$ ,  $[A]$  a  $[L]$  jsou rovnovážné koncentrace komplexu, volného analytu a ligandu. Za předpokladu, že ustavování rovnováhy (23) je významně rychlejší než pohyb látek v důsledku elektromigrace, je efektivní mobilita analytu  $u_{eff}$  dána vztahem (3), který v tomto případě přechází na tvar:

$$u_{eff} = \frac{[A]}{[A] + [C]} u_f + \frac{[C]}{[A] + [C]} u_C \quad (26)$$

Po dosazení ze vztahu (25) lze tuto rovnici upravit na tvar:

$$u_{eff} = \frac{u_f + K'[L]u_C}{1 + K'[L]} \quad (27)$$

respektive

$$K'[L] = \frac{u_{eff} - u_f}{u_C - u_{eff}} \quad (28)$$

Pokud je koncentrace analytu malá ve srovnání s koncentrací ligandu nebo je komplexace slabá, lze rovnovážnou koncentraci ligandu ve vztazích (27) a (28) nahradit jeho analytickou (celkovou) koncentrací v BGE [42].

Interagující složkou BGE mohou být micely nebo smíšené micely, ale i cyklodextriny nebo makrocyclická antibiotika. Základní elektrolyt může obsahovat i více interagujících složek.

V případě micelárních systémů je ligandem, se kterým analyt interaguje, zpravidla míněna celá micela a koncentrace micel  $c_M$  se určuje podle vzorce:

$$c_M = \frac{c_{\text{det}} - c^*}{N_{ag}} \quad (29)$$

Agregační číslo se v rámci použitých koncentrací detergentu pokládá za konstantní.

Pokud budeme za ligand považovat nikoli celou micelu, ale molekulu detergentu do micely zapojenou (její koncentrace bude  $(c_{\text{det}} - c^*)$ ), můžeme odvodit vzájemný vztah retenčního faktoru  $k$  a zdánlivé rovnovážné konstanty  $K'$  [42]:

$$k = \frac{n_{mic}}{n_{aq}} = \frac{[C]}{[A]} = \frac{[C]}{[A] \cdot [L]} \cdot [L] = K' \cdot [L] \quad (30)$$

Porovnáním s rovnicí (20) získáme vztah zdánlivé rovnovážné konstanty  $K'$  a partičního koeficientu  $P$ :

$$K' \cong P \cdot \bar{v} \quad (31)$$

#### *Interakce analytu s micelami*

Na základě chromatografického přístupu a vztahů (20) a (22) stanovili Kaneta *et al.* [43] partiční koeficient pro anorganické anionty interagující s micelami kationického detergentu (cetyl trimethyl amonium chloridu), Katsuta a Nakatani [44] pro komplexy lanthanoidů s acetylacetonátem interagující s micelami SDS (model zahrnoval rovnováhu mezi nabitými a nenabitými komplexy kovů), Haddad *et al.* [45] pro anionické komplexy kovů interagující s micelami SDS (model zahrnoval vliv přídavku methanolu do BGE).

Řada autorů využívá při popisu interakce mezi různými analyty a micelami (kationickými [46, 47], nenabitými micelami [48, 49] a micelami SDS [29, 30, 50, 51]) elektroforetický přístup a vztah (27). Některé modely zahrnovaly i další rovnováhy – acidobazickou rovnováhu analytu [46], interakci analytu s monomerem detergentu [29, 30], acidobazickou rovnováhu analytu i jeho interakci s monomerem [47], nebo interakci s monomerem a asociaci komplexu analyt-monomer s micelou [51].

Většina autorů využívajících elektroforetický přístup považuje za ligand, se kterým micela interaguje, celou micelu. Lin *et al.* [50] považovali za koncentraci ligandu koncentraci dodecylsulfátu tvořícího micely  $(c_{\text{det}} - c^*)$ .

Rundlett *et al.* [5, 52] při popisu interakcí vycházeli ze vztahu (28), který rozšířili, aby zahrnoval interakce se dvěma složkami BGE. Takto stanovili zdánlivé komplexační konstanty pro interakce chirálních analytů s micelami SDS a vankomycinem současně obsaženými v BGE. V práci [52] stanovili  $K'$  také pro interakce s micelami SDS a cyklodextrinem.

Interakce malých anorganických iontů, které jsou často součástí BGE, s micelami zatím nebyla v literatuře dostatečně popsána.

#### *Stanovení mobility EOF v interagujících systémech*

K určování fyzikálně chemických konstant pomocí kapilární elektroforézy je třeba stanovit velmi přesně hodnoty efektivních mobilit a tedy i mobilitu EOF. Wang *et al.* [53] ve svém review podávají přehled metod stanovení EOF, ne všechny jsou ale vhodné pro BGE obsahující nabitou interagující složkou.

Neutrální marker může interagovat s touto složkou BGE – pak se pohybuje i vlastní efektivní mobilitou a jeho rychlost není dána pouze rychlostí EOF. Fuguet *et al.* [54] posuzovali vhodnost neutrálních markerů pro různé micelární systémy. Nejvhodnějšími markery pro BGE obsahující micely SDS byly formamid a dimethyl sulfoxid, pro dodecylsulfát lithný (LiDS) byl nejvhodnější formamid a vhodné byly i dimethyl sulfoxid a thiomočovina. U žádného z těchto markerů však nelze zcela vyloučit jeho interakci s micelami, která může zatížit chybou výsledky stanovení interakčních konstant, zejména pro slabě interagující analyty.

Dalšími metodami určení mobility EOF v principu vhodnými pro interagující BGE jsou:

- Měření hmotnosti roztoku eluovaného působením elektroosmózy [55] –  
– může být problematické pro krátká měření nebo pomalý EOF [56]).
- Výpočet EOF na základě měření  $\zeta$ -potenciálu, konkrétně proudového potenciálu (*streaming potential*), který je stejně jako EOF na  $\zeta$ -potenciálu závislý [55, 57] –  
– stanovuje se samostatným měřením, takže neposkytuje hodnotu EOF při konkrétním experimentu.
- Sledování proudu procházejícího kapilárou během experimentu [58, 59] –  
– může být rušeno reakcemi na elektrodách [56] a vyžaduje přítomnost dvou BGE o různých vodivostech v kapiláře.
- Vstup referenčního proudu fluorescenčního markeru do kapiláry za detekční zónou [60] – vyžaduje instrumentaci, která není komerčně dostupná [56].

### Metoda stanovení mobility v interagujícím BGE

Williams a Vigh [56] navrhli metodu, při které je zóna analytu v kapiláře obklopena BGE s interagující složkou, zatímco zóna neutrálního EOF markeru je obklopena BGE bez této složky. Pomocí mobilizace obsahu kapiláry aplikací tlaku je detektorem umístěným přibližně uprostřed kapiláry zaznamenána původní vzájemná vzdálenost zóny analytu a zóny markeru a jejich vzdálenost po krátké aplikaci napětí na kapiláru. Z jejich rozdílu – čili vzdálenosti, kterou analyt urazil přes roztok migračním pohybem  $L_{mig}$  – je pak stanovena mobilita analytu.

V nehomogenně naplněné kapiláře není  $\zeta$ -potenciál konstantní podél celé její délky a tedy není konstantní ani rychlost EOF. To ale způsobuje vznik laminárního toku a ve výsledku je celkový tok kapilárou (daný kombinací EOF a laminárního toku) konstantní po celé délce kapiláry [56].

Základní předpoklad fungování této metody je, že vzdálenost zóny analytu a zóny markeru se během aplikace napětí mění pouze v důsledku migračního pohybu analytu. Autoři uvádějí, že ten je splněn pokud:

- 1) vnitřní průměr kapiláry je malý;
- 2) délka zóny analytu je mnohem větší než poloměr kapiláry;
- 3) zóna BGE s interagující složkou obklopující analyt je delší než zóna analytu;
- 4) vzorek má vysoký difúzní koeficient (jedná se o malou molekulu).

Protože při experimentu je kapilára naplněna dvěma BGE o různých vodivostech, není při vložení napětí intenzita elektrického pole konstantní po celé délce kapiláry a není ji tedy možné počítat jako podíl vloženého napětí a celkové délky kapiláry (viz rovnici (2)).

Intenzita elektrického pole v libovolném místě kapiláry je dána vztahem:

$$E = \frac{j}{\kappa} \quad (32)$$

kde  $j$  je proudová hustota a  $\kappa$  vodivost v daném místě kapiláry. Při konstantním průřezu  $S$  je proudová hustota konstantní po celé délce kapiláry a je dána podílem protékajícího proudu a průřezu kapiláry. V heterogenně naplněné kapiláře pak lze intenzitu pole  $E_{het,M}$  v zóně interagujícího BGE stanovit na základě znalosti vodivosti tohoto BGE  $\kappa_M$  a procházejícího proudu  $I_{het}$ :

$$E_{het,M} = \frac{I_{het}}{S \cdot \kappa_M} \quad (33)$$

Vodivost interagujícího BGE se stanoví v samostatných experimentech, při kterých je tímto BGE naplněna celá kapilára a intenzitu pole lze vyjádřit jako podíl aplikovaného napětí a celkové délky kapiláry:

$$\kappa_M = \frac{I_{hom}}{S \cdot E_{hom}} = \frac{I_{hom} \cdot L_T}{S \cdot U} \quad (34)$$

kde  $I_{hom}$  je proud procházející homogenně naplněnou kapilárou a  $E_{hom}$  je intenzita pole v této kapiláře.

Vzdálenost  $L_{mig}$ , kterou analyt urazil migračním pohybem během doby  $t_U$ , kdy bylo na kapiláru vloženo napětí, je dána časovým integrálem rychlosti migrace analytu  $v$ . Rychlost  $v$  je součinem efektivní pohyblivosti analytu  $u_{eff}$  a intenzity elektrického pole v zóně BGE s interagující složkou  $E_{het,M}$ , za kterou lze následně dosadit z rovnice (33). Tento postup je naznačen v rovnici (35):

$$L_{mig} = \int_0^{t_U} v(t) \cdot dt = u_{eff} \int_0^{t_U} E_{het,M}(t) \cdot dt = \frac{u_{eff}}{S \cdot \kappa_M} \int_0^{t_U} I_{het}(t) \cdot dt \quad (35)$$

Úpravou rovnice (35) vznikne výsledný vztah pro výpočet efektivní mobility analytu:

$$u_{eff} = \frac{L_{mig} \cdot S \cdot \kappa_M}{\int_0^{t_U} I_{het}(t) \cdot dt} \quad (36)$$

Efektivní mobilita  $u_{eff}$  se tedy stanoví ze vzdálenosti  $L_{mig}$ , integrálu proudu prošlého kapilárou během aplikace napětí, vodivosti interagujícího BGE a průřezu kapiláry.

Na rozdíl od problematických metod, jako je například měření hmotnosti roztoku eluovaného působením elektroosmózy, nebo měření  $\zeta$ -potenciálu, používá tato metoda Williamse a Vigha [56] neutrální marker a přitom eliminuje jeho interakci s interagující složkou BGE. Její nevýhodou je, že vzdálenost, kterou analyt urazil migračním pohybem, se stanovuje čistě na základě mobilizace obsahu kapiláry pomocí tlaku. To vyžaduje, aby tlak aplikovaný na kapiláry byl velmi stabilní a nedocházelo k jeho fluktuacím, což bývá u komerčních přístrojů problematické. Další nevýhodou této metody je, že vyžaduje umístění UV detektoru přibližně uprostřed kapiláry, což je u komerčně dostupných přístrojů neproveditelné.

## 2. Cíle práce

- Navrhnout metodu stanovení efektivní mobility analytu v BGE obsahujícím interagující složku založenou na stejném principu jako metoda Williamse a Vigha [56], ale proveditelnou na komerčně dostupném přístroji pro kapilární elektroforézu.
- Na základě měření touto metodou zvolit vhodný EOF marker pro stanovení mobilit v základních elektrolytech obsahujících dodecylsulfátové micely.
- Ověřit, nakolik je instrumentace pro kapilární elektroforézu vhodná pro metody kapilární elektroforézy vyžadující aplikaci tlaku a tedy i ke stanovování viskozit BGE.
- Provést vlastní stanovení závislosti efektivních mobilit alkalických kationtů na koncentraci dodecylsulfátu lithného.

### 3. Experimentální část

#### 3.1. Použité chemikálie

Dodecylsulfát lithný (LiDS) – Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika

Monohydrát hydroxidu lithného – Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika

Morfolinopropansulfonová kyselina (MOPS) – Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika

Imidazol – Fluka, Praha, Česká republika

Thiomočovina – Fluka, Praha, Česká republika

Chlorid cesný – Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika

Chlorid draselný – Lachema, Brno, Česká republika

Chlorid sodný – Lachema, Brno, Česká republika

NaOH (1,0 M a 0,1 M roztoky na proplachování kapiláry) –

– Agilent Technologies, Waldbronn, Německo

Hexadimethrin bromid (polybren) – Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika

Dextransulfát sodný – Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika

Pro přípravu roztoků a k promývání kapiláry byla použita deionizovaná voda upravená systémem Ultrapur a Rowapur (Watrex, San Francisco, USA).

Všechny roztoky (základní elektrolyty i vzorky) byly filtrovány pomocí filtrů s průměrem pórů 45 µm (Supelco, Bellefonte, USA).

#### 3.2. Instrumentace

Elektroforetické experimenty byly prováděny na přístroji Agilent <sup>3D</sup>CE 1600 pro kapilární elektroforézu (Agilent Technologies, Waldbronn, Německo), k ovládání aparatury a sběru dat sloužil program ChemStation od téhož dodavatele.

Hodnota pH použitých BGE byla měřena pomocí pH-metru PHM240 pH/ION Meter (Radiometer analytical, Lyon, Francie).

Všechna měření byla prováděna při 25 °C.



### *Detekce při elektroforetických experimentech*

Byly použity dva způsoby detekce:

- 1) UV/VIS spektrofotometrický detektor s diodovým polem (DAD – *diod array detector*) vestavěný v přístroji <sup>3D</sup>CE pro kapilární elektroforézu (Agilent Technologies, Waldbronn, Německo), dále se označuje jako *UV detektor*;
- 2) bezkontaktní vodivostní detektor vyvinutý v naší laboratoři [7].

### 3.3. Zpracování dat

Píky analytů deformované elektromigrační disperzí byly proloženy Haarhoffovou – Van der Lindeho (HVL) funkcí, což umožňovalo přesnější určení jejich polohy [61, 62].

Píky výrazně rozmyté difúzí, které ale nebyly deformovány elektromigrační disperzí (píky neutrálního markeru, píky z měření viskozity), byly pro přesnější určení polohy maxima prokládány Gaussovou funkcí.

Prokládání experimentálních dat regresními funkcemi bylo prováděno v programech Origin 6.1 nebo Origin 8.1 (OriginLab Corporation, Northampton, USA).

### 3.4. Experimentální podmínky

V rámci této práce byla prováděna řada měření, která se lišila experimentálními podmínkami.

#### 3.4.1) Dvoudetektorová metoda

- a) Určení korekce proudu měřeného přístrojem pro kapilární elektroforézu
- b) Určení geometrie pro dvoudetektorovou metodu
- c) Měření pohyblivosti sodného kationtu dvoudetektorovou metodou
- d) Stanovení vodivosti základních elektrolytů použitých ve dvoudetektorové metodě
- e) Orientační měření viskozity
- f) Klasická měření pohyblivosti sodného kationtu pro srovnání s dvoudetektorovou metodou

#### 3.4.2) Stanovování viskozity pomocí instrumentace pro kapilární elektroforézu

#### 3.4.3) Závislost mobility alkalických kationtů na koncentraci LiDS

- a) Měření pohyblivosti v roztocích o koncentraci LiDS 0 až 50 mM
- b) Měření pohyblivosti v roztocích o koncentraci LiDS 0 až 100 mM

### 3.4.1. Dvoudetektorová metoda

#### a) Určení korekce proudu měřeného přístrojem pro kapilární elektroforézu

Přístroj pro kapilární elektroforézu neměří hodnotu proudu procházejícího kapilárou zcela přesně. Proto byla na základě měření proudu připojeným vnějším multimetrem (195A Digital Multimetr, Keithley Instruments, Cleaveland, USA) stanovena potřebná korekce.

#### *Roztoky*

Měření byla prováděna v 40 mM a 10 mM roztoku chloridu draselného.

#### *Kapilára*

výrobce: Polymicro Technologies, Phoenix, USA

vnitřní průměr: 50  $\mu\text{m}$ ; vnější průměr: 375  $\mu\text{m}$

celková délka: 46,6 cm

Nová kapilára byla promyta 5 minut destilovanou vodou, 5 minut 1,0 molárním roztokem NaOH a 3 minuty vodou. Poté byl vnitřní povrch kapiláry pokryt nekovalentně adsorbovaným polybrenem a následně nekovalentně adsorbovaným dextran sulfátem podle postupu uvedenému v publikaci [22]. Před každým experimentem byla kapilára propláchnuta 2 minuty základním elektrolytem.

Ve stejné kapiláře byla prováděna i měření pohyblivostí v roztocích o koncentraci LiDS 0 až 50 mM (odstavec 3.4.3a) a měření pohyblivostí v roztocích o koncentraci LiDS 0 až 100 mM (odstavec 3.4.3b).

#### *Parametry experimentů*

K přístroji pro kapilární elektroforézu byl za kapiláru do série zapojen multimetr. Na kapiláru naplněnou roztokem bylo vloženo napětí, po přibližně jedné minutě byla zaznamenána hodnota proudu procházejícího kapilárou udávaná přístrojem a hodnota udávaná vnějším multimetrem. Poté se na kapiláru vložilo napětí o vyšší hodnotě a postup se opakoval. Postupně byla na kapiláru vkládána napětí v rozmezí 0,1 až 20 kV (viz tabulku 6 v kapitole 4.1).

## **b) Určení geometrie pro dvoudetektorovou metodu**

### *Roztoky*

Při měřeních byla kapilára naplněná vodou. Vzorek obsahovaly 40 mM NaCl a 1 mM thiomočovinu.

### *Kapilára*

výrobce: Polymicro Technologies, Phoenix, USA

vnitřní průměr: 50  $\mu\text{m}$ ; vnější průměr: 375  $\mu\text{m}$

celková délka: 99,3 cm

délka k UV detektoru: 90,8 cm

Nová kapilára byla promyta 6 minut destilovanou vodou, 10 minut 1,0 M roztokem NaOH a 15 minut vodou.

Před každým jednotlivým experimentem byla kapilára promývána 9 minut základním elektrolytem (platí pro všechny experimenty prováděné v této kapiláře).

V této kapiláře byla prováděna i měření pohyblivosti sodného kationtu dvoudetektorovou metodou; měření vodivosti a orientační měření viskozity BGE použitých ve dvoudetektorové metodě; klasická měření pohyblivosti sodného kationtu pro srovnání s dvoudetektorovou metodou.

### *Parametry experimentů*

dávkování vzorku: hydrodynamicky 10 mbar po dobu 15 s

aplikovaný tlak: 40 mbar

sledovaná vlnová délka: 238 nm

počet opakování experimentu: 24 před započítáním ostatních měření v kapiláře

5 po skončení měření dvoudetektorovou metodou

Vzorek byl hydrodynamicky protlačen kapilárou a jeho průchod byl postupně zaznamenán vodivostním i UV detektorem (238 nm).

## **c) Měření pohyblivosti sodného kationtu dvoudetektorovou metodou**

### *Roztoky*

Složení BGE je uvedeno v Tabulka 1. Iontová síla použitých BGE byla udržována konstantní, přibližně 157 mM, a hodnota pH 7,13 až 7,16. Ve všech základních elektrolytech byla stejná koncentrace imidazolu, který sloužil jako UV absorbující složka BGE umožňující nepřímou detekci.

**Tabulka 1: Složení BGE pro měření pohyblivosti sodného kationtu dvoudetektorovou metodou.**

základní elektrolyt	$c(\text{LiDS})$ /mM	$c(\text{LiOH})$ /mM	$c(\text{MOPS})$ /mM	$c(\text{imidazol})$ /mM
D00	0,0	100	300	100
D10	10	90	280	100
D20	20	80	260	100
D30	30	70	240	100
D40	40	60	220	100
D50	50	50	200	100
D60	60	40	180	100
D70	70	30	160	100

Stejné roztoky se používaly i při klasických měřeních pohyblivosti sodného kationtu pro srovnání s dvoudetektorovou metodou.

Zóna analytu (dávkováná ve fázi 1, viz kapitolu 4.1) obsahovala kromě složek BGE 40 mM chlorid sodný a 1 mM thiomočovinu.

Zónou markeru (dávkovanou ve fázi 4, viz kapitolu 4.1) byl 4 mM roztok thiomočoviny ve vodě.

#### *Kapilára*

Byla použita kapilára popsaná v odstavci 3.4.1b *Určení geometrie pro dvoudetektorovou metodu*.

#### *Parametry experimentů*

sledované vlnové délky: 238 nm, 214 nm

počet opakování experimentu: 4 až 6

Konkrétní provedení experimentů je popsáno v Tabulka 5 v kapitole 4.1.

#### *Detekce*

Průchod zóny vzorku obsahujícího chlorid sodný byl zaznamenán na vodivostním detektoru. Na UV detektoru byla zóna analytu registrována nepřímou detekcí umožněnou přítomností imidazolu v BGE (214 nm).

Systémový pík (*water gap*) byl zaznamenán vodivostním detektorem a UV detektorem (díky nepřímé detekci při 214 nm). Thiomočovina byla registrována na UV detektoru při 238 nm.

#### **d) Stanovení vodivosti základních elektrolytů použitých ve dvoudetektorové metodě**

##### *Roztoky*

Měření byla prováděna ve stejných BGE jako měření pohyblivosti sodného kationtu dvoudetektorovou metodou, jejich složení je uvedeno v Tabulka 1.

##### *Kapilára*

Byla použita kapilára popsaná v odstavci 3.4.1b *Určení geometrie pro dvoudetektorovou metodu*.

##### *Parametry experimentů*

aplikované napětí: 15 kV

doba trvání jednoho experimentu: 3 minuty

#### **e) Orientační měření viskozity**

##### *Roztoky*

Měření byla prováděna ve stejných BGE jako měření pohyblivosti sodného kationtu dvoudetektorovou metodou, jejich složení je uvedeno v Tabulka 1.

Vzorky obsahovaly kromě složek BGE 40 mM chlorid sodný a 1 mM thiomočovinu.

##### *Kapilára*

Byla použita kapilára popsaná v odstavci 3.4.1b *Určení geometrie pro dvoudetektorovou metodu*.

##### *Parametry experimentů*

dávkování vzorku: hydrodynamicky 10 mbar po dobu 15 s

aplikovaný tlak: 40 mbar

sledovaná vlnová délka: 238 nm

počet opakování experimentu: 3

Vzorek byl hydrodynamicky protlačen kapilárou a jeho průchod byl postupně zaznamenán vodivostním i UV detektorem (238 nm).

#### **f) Klasická měření pohyblivosti sodného kationtu**

##### **pro srovnání s dvoudetektorovou metodou**

###### *Roztoky*

Měření byla prováděna ve stejných BGE jako měření pohyblivosti sodného kationtu dvoudetektorovou metodou, jejich složení je uvedeno v Tabulka 1.

Vzorky obsahovaly kromě složek základního elektrolytu 40 mM chlorid sodný a 1 mM thiomočovinu.

###### *Kapilára*

Byla použita kapilára popsaná v odstavci 3.4.1b *Určení geometrie pro dvoudetektorovou metodu*.

###### *Parametry experimentů*

dávkování vzorku: hydrodynamicky 10 mbar po dobu 15 s (v BGE D00 – D50)

hydrodynamicky 20 mbar po dobu 15 s (v BGE D60 a D70)

aplikované napětí: 15 kV

sledovaná vlnová délka: 238 nm, 214 nm

počet opakování experimentu: 6

###### *Detekce*

Zóna analytu byla registrována vodivostním detektorem i UV detektorem (nepřímá detekce při 214 nm). Sledovaný systémový pík byl registrován vodivostním detektorem, thiomočovina byla registrována UV detektorem (238 nm).

#### **3.4.2. Stanovování viskozity pomocí instrumentace pro kapilární elektroforézu**

###### *Roztoky*

Složení dvou roztoků, jejichž viskozita byla stanovována je uvedeno v Tabulka 2. Použité vzorky obsahovaly 0,5 mM thiomočovinu a 2 mM chlorid sodný rozpuštěné v roztoku, jehož viskozita byla stanovována, složení vzorků umožňovalo jejich detekci na vodivostním i UV detektoru (238 nm).

**Tabulka 2: Složení roztoků, jejichž viskozita byla stanovována pomocí instrumentace pro kapilární elektroforézu.**

roztok	$c(\text{LiDS})$ /mM	$c(\text{LiOH})$ /mM	$C(\text{MOPS})$ /mM
1	100	60	120
2	0	160	320

#### *Kapilára 1*

výrobce: Polymicro Technologies, Phoenix, USA

vnitřní průměr: 50  $\mu\text{m}$ ; vnější průměr: 375  $\mu\text{m}$

celková délka: 70,8 cm

délka k vodivostnímu detektoru: 33,7 cm

délka k UV detektoru: 62,3 cm

Před použitím byla kapilára promyta 5 minut destilovanou vodou, 5 minut 1,0 M roztokem NaOH a 6 minut vodou. Před každým experimentem byla promyta 3 minuty stanovovaným roztokem.

#### *Kapilára 2*

výrobce: CaCo, Bratislava, Slovenská republika

vnitřní průměr: 25  $\mu\text{m}$ ; vnější průměr: 375  $\mu\text{m}$

celková délka: 58,5 cm

délka k vodivostnímu detektoru: 21,7 cm

délka k UV detektoru: 50,0 cm

Před použitím byla kapilára promyta 10 minut destilovanou vodou, 15 minut 1,0 M roztokem NaOH a 10 minut vodou. Před každým experimentem byla promyta 5 minuty stanovovaným roztokem.

#### *Parametry experimentů v kapiláře 1*

dávkování vzorku: hydrodynamicky 40 mbar po dobu 10 s

aplikace napětí před experimentem (u poloviny experimentů): 15 kV po 5 minut

aplikovaný tlak: 20 mbar

sledovaná vlnová délka: 238 nm

počet opakování experimentu: 4

### *Parametry experimentů v kapiláře 2*

dávkování vzorku: hydrodynamicky 40 mbar po dobu 15 s

aplikace napětí před experimentem (u poloviny experimentů): 15 kV po 5 minut

aplikovaný tlak: 20 mbar

sledovaná vlnová délka: 238 nm

počet opakování experimentu: 4

Po propláchnutí kapiláry (a v polovině experimentů po krátké aplikaci napětí) byl vzorek protlačen kapilárou a zaznamenán vodivostním i UV detektorem.

Statistické zpracování výsledků bylo prováděno v programu NCSS (NCSS, Kaysville, USA).

### *Parametry srovnávacích experimentů*

Srovnávací měření viskozity byla prováděna na viskozimetru Vistec (Vistec, Praha, Česká republika) s fotoelektrickou registrací průtokové doby.

počet opakování experimentu: 15 (voda)

20 (roztok 1)

10 (roztok 2)

### **3.4.3. Závislost mobility alkalických kationtů na koncentraci LiDS**

#### **a) Měření pohyblivosti v roztocích o koncentraci LiDS 0 až 50 mM**

##### *Roztoky*

Složení jednotlivých BGE je uvedeno v Tabulka 3, iontová síla použitých BGE byla udržována konstantní, přibližně 77 až 78 mM) a hodnota pH 7,14 až 7,18.

Vzorky obsahovaly kromě složek BGE analyt (chlorid cesný, draselný, sodný) o koncentraci 3 mM a thiomocovinu jako EOF marker o koncentraci 0,5 mM.

##### *Kapilára*

výrobce: Polymicro Technologies, Phoenix, USA

vnitřní průměr: 50  $\mu\text{m}$ ; vnější průměr: 375  $\mu\text{m}$

celková délka: 46,6 cm

délka k vodivostnímu detektoru: 33,0 cm



**Tabulka 3: Složení BGE pro měření pohyblivosti v roztocích o koncentraci LiDS 0 – 50 mM.**

základní elektrolyt	$c(\text{LiDS})$ /mM	$c(\text{LiOH})$ /mM	$c(\text{MOPS})$ /mM	$c(\text{imidazol})$ /mM
BE00	0,0	50	150	50
BE05	5,0	45	140	50
BE10	10	40	130	50
BE20	20	30	110	50
BE30	30	20	90	50
BE40	40	10	70	50
BE50	50	0,0	50	50

délka k UV detektoru: 38,1 cm

Před použitím byla kapilára promyta 5 minut destilovanou vodou, 5 minut 1,0 molárním roztokem NaOH a 3 minuty vodou. Poté byl vnitřní povrch kapiláry pokryt nekovalentně adsorbovaným polybrenem a následně nekovalentně adsorbovaným dextran sulfátem podle postupu uvedeného v publikaci [22] pro docílení stabilního a rychlého EOF.

Při změně BGE byla kapilára propláchnuta minimálně 5 minut destilovanou vodou a poté minimálně 3 minuty základním elektrolytem. Před každým jednotlivým experimentem byla kapilára propláchnuta 3 minuty základním elektrolytem.

Ve stejné kapiláře bylo prováděna i určení korekce proudu měřeného přístrojem pro kapilární elektroforézu (odstavec 3.4.1a) a měření pohyblivosti v roztocích o koncentraci LiDS 0 až 100 mM (odstavec 3.4.3b).

#### *Parametry experimentů*

dávkování vzorku: hydrodynamicky 10 mbar po dobu 15 s

aplikované napětí: 15 kV

sledované vlnové délky: 238 nm, 214 nm

počet opakování experimentu: 3

#### *Detekce*

Migrační čas alkalických kationtů byl stanovován z vodivostní detekce. Průchod zóny thiomocoviny (EOF markeru) byl registrován UV detekcí (238 nm).

**Tabulka 4: Složení BGE pro měření pohyblivostí v roztocích o koncentraci LiDS 0 – 100 mM.**

základní elektrolyt	$c(\text{LiDS})$ /mM	$c(\text{LiOH})$ /mM	$c(\text{MOPS})$ /mM
MI00	0	160	320
MI10	10	150	300
MI20	20	140	280
MI30	30	130	260
MI40	40	120	240
MI50	50	110	220
MI60	60	100	200
MI70	70	90	180
MI80	80	80	160
MI90	90	70	140
MI100	100	60	120

**b) Měření pohyblivostí v roztocích o koncentraci LiDS 0 až 100 mM***Roztoky*

Složení jednotlivých BGE je uvedeno v Tabulka 4. Iontová síla použitých BGE byla udržována konstantní, přibližně 160 mM a hodnota pH 7,09.

Vzorky obsahovaly kromě složek BGE analyt (chlorid cesný, draselný, sodný) o koncentraci 2 mM a thiomočovinu jako marker elektroosmotického toku o koncentraci 0,5 mM.

*Kapilára*

Byla použita stejná kapilára, jako při měření pohyblivostí v roztocích o koncentraci LiDS 0 až 50 mM (odstavec 3.4.3a) a určení korekce proudu měřeného přístrojem pro kapilární elektroforézu (odstavec 3.4.1a).

*Parametry experimentů*

dávkování vzorku: hydrodynamicky 10 mbar po dobu 15 s

aplikované napětí: 15 kV

sledovaná vlnová délka: 238 nm

počet opakování experimentu: 4

*Detekce*

Migrační čas alkalických kationtů a nulové systémové zóny byl stanovován z vodivostní detekce. Průchod zóny thiomočoviny (EOF markeru) byl registrován UV detekcí (238 nm).

## 4. Výsledky a diskuse

### 4.1. Dvoudetektorová metoda

Pro stanovení fyzikálně chemických konstant, jako jsou interakční konstanty, pomocí kapilární elektroforézy je nutná znalost přesných efektivních mobilit analytu. V interagujících systémech ale může být stanovená mobilita zatížena chybou způsobenou nepřesným určením rychlosti EOF. Proto byla v rámci této práce navržena dvoudetektorová metoda stanovení přesné mobility neovlivněné rychlostí ani případnými fluktuacemi EOF.

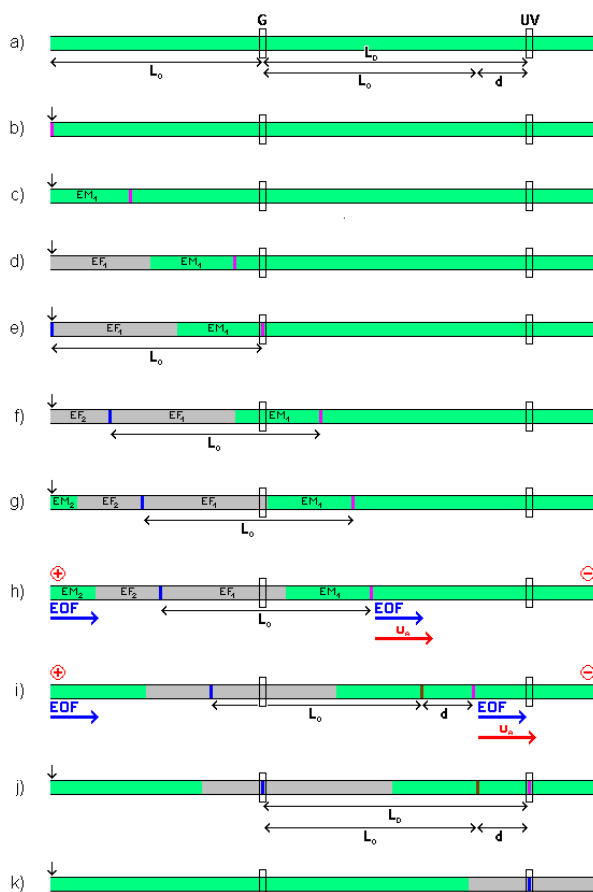
Tato metoda je založena na stejném principu, jako metoda publikovaná Williamsem a Vighem [56] – zatímco analyt se při experimentu nachází v BGE obsahujícím interagující složku, neutrální marker je umístěn v zóně BGE bez této složky.

Metoda Williamse a Vigha vyžaduje instrumentaci, která není komerčně dostupná (UV detektor musí být přibližně uprostřed kapiláry). Vzdálenost, kterou analyt urazil migračním pohybem a která je základem pro výpočet efektivní mobility, se stanovuje čistě na základě mobilizace obsahu kapiláry aplikací tlaku. To vyžaduje, aby aplikovaný tlak byl velmi přený a stabilní, což je u komerčních přístrojů problematické.

Zde představovaná dvoudetektorová metoda je vhodná pro libovolnou komerční aparaturu, v níž je možné provést detekci pomocí dvou detektorů. Základem pro stanovení vzdálenosti, kterou analyt urazil migračním pohybem, je znalost umístění kapiláry v detektorech a mobilizace obsahu kapiláry tlakem slouží pouze ke stanovení malých korekčních vzdáleností (jak bude vysvětleno dále). Dvoudetektorová metoda tedy může být ve srovnání s metodou Williamse a Vigha výrazně přesnější.

#### a) Princip dvoudetektorové metody

Metoda je popsána na základě konkrétního uspořádání pro stanovení mobility kladně nabitého analytu (sodného kationtu) v BGE se záporně nabitou interagující látkou (dodecylsulfátovými micelami). Při vhodně pozměněném experimentálním uspořádání může být princip této metody použit i pro jinou kombinaci nábojů analytu a interagující složky BGE.



**Obrázek 1: Průběh experimentu dvoudetektorovou metodou; zelená – BGE s micelami; šedá – BGE bez micel; růžová – zóna analytu; modrá – zóna markeru; hnědá – původní pozice analytu v roztoku; G – vodivostní detektor; UV – UV detektor; a) – schéma uspořádání před začátkem experimentu; b) – fáze 1; c) – fáze 2; d) – fáze 3; e) – fáze 4; f) – fáze 5; g) – fáze 6; h) začátek fáze 7; i) – konec fáze 7; j) – fáze 8; k) – fáze 9.**

### *Uspořádání a jednotlivé fáze metody*

Schéma umístění detektorů na kapiláře je uvedeno na Obrázek 1a. Vzdálenost od počátku kapiláry k vodivostnímu detektoru je  $L_0$ , vzdálenost mezi oběma detektory je  $L_D$ , přičemž platí:

$$L_D = L_0 + d \quad (37)$$

Je vhodné, aby se vzdálenosti  $L_0$  a  $L_D$  pohybovaly v desítkách centimetrů a jejich rozdíl  $d$  byl větší než deset centimetrů. Protože standardní vzdálenost mezi vodivostním a UV detektorem je přibližně jen 5,5 cm, byl tento úsek prodloužen pomocí dvou smyček na kapiláře a vzdálenost  $L_D$  pak byla 52,8 cm.

Metoda zahrnuje devět fází, které jsou popsány v následujícím textu a znázorněny na Obrázek 1.

Na počátku experimentu je kapilára naplněna základním elektrolytem obsahujícím micely, Obrázek 1a.

Fáze 1: Na začátek kapiláry se hydrodynamicky nadávkuje zóna vzorku obsahujícího analyt (v našem případě chlorid sodný), Obrázek 1b.

Fáze 2: Hydrodynamicky se zóna vzorku posouvá dále do kapiláry za současného plnění kapiláry BGE s micelami (do kapiláry se vpravuje zóna  $EM_1$ ), Obrázek 1c.

Fáze 3: Na začátku kapiláry se vymění zásobní vialka za vialku s BGE bez micel a do kapiláry se vtlačuje BGE bez micel (zóna  $EF_1$ ), Obrázek 1d.

Fáze 4: V okamžiku, kdy zóna vzorku prochází vodivostním detektorem, se na počátek kapiláry nadávkuje zóna obsahující EOF marker (v našem případě thiomocovinu), Obrázek 1e.

Fáze 5: Do kapiláry se tlakem vpravuje BGE bez micel (zóna  $EF_2$ ), Obrázek 1f.

Fáze 6: Vymění se zásobní vialka na začátku kapiláry a plní se tlakem BGE s micelami (zóna  $EM_2$ ), Obrázek 1g.

Fáze 7: Oba konce kapiláry jsou umístěny v zásobních vialkách obsahujících BGE s micelami. Na kapiláru se vloží napětí a je aplikováno tak dlouho, aby se analyt v důsledku migrace vzdálil ze své původní pozice v roztoku právě o vzdálenost  $d$ , Obrázek 1h a 1i.

Fáze 8: Obsah kapiláry se mobilizuje působením tlaku. V ideálním případě projde zóna markeru vodivostním detektorem současně s průchodem zóny analytu UV detektorem, Obrázek 1j.

Fáze 9: V protlačování roztoku kapilárou se pokračuje, dokud není zóna markeru zaznamenána UV detektorem, Obrázek 1k.

Konkrétní provedení jednotlivých fází metody pro jednotlivé BGE je popsáno v Tabulka 5.

#### *Princip metody – ideální případ*

Protože zóna markeru je ve fázi 4 nadávkována právě v okamžiku, kdy zóna vzorku prochází vodivostním detektorem, je původní vzdálenost mezi oběma zónami rovna právě  $L_0$ . Během dalšího plnění kapiláry základními elektrolyty se tato vzájemná vzdálenost obou zón nemění.

**Tabulka 5: Parametry metod používaných při měřeních dvoudetektorovou metodou; EM – BGE obsahující micely, EF – BGE bez micel, jednotlivé zóny BGE jsou vyznačeny na Obrázek 1).**

c(LiDS) v EM	fáze 1 dávkování zóny vzorku	fáze 2 vtlačování zóny EM <sub>1</sub> 40 mbar *	fáze 3 vtlačování zóna EF <sub>1</sub> 40 mbar *	fáze 5 vtlačování zóny EF <sub>2</sub> 40 mbar *	fáze 6 vtlačování zóny EM <sub>2</sub> 40 mbar *	fáze 7 aplikace napětí 15 kV *
0 mM	10 mbar * 15 s	* 11,4 min	* 10,8 min	* 10,0 min	* 0,5 min	* 3,8 min
10 mM	10 mbar * 15 s	* 11,4 min	* 10,8 min	* 10,0 min	* 0,5 min	* 3,9 min
20 mM	10 mbar * 15 s	* 11,4 min	* 10,8 min	* 10,0 min	* 0,5 min	* 4,0 min
30 mM	10 mbar * 15 s	* 11,4 min	* 10,8 min	* 10,0 min	* 0,5 min	* 4,2 min
40 mM	10 mbar * 15 s	* 11,4 min	* 10,8 min	* 10,0 min	* 0,5 min	* 4,4 min
50 mM	10 mbar * 15 s	* 11,4 min	* 10,8 min	* 9,0 min	* 0,5 min	* 4,6 min
60 mM	20 mbar * 15 s	* 8,8 min	* 13,4 min	* 8,3 min	* 0,2 min	* 4,8 min
70 mM	20 mbar * 15 s	* 8,8 min	* 13,4 min	* 8,3 min	* 0,2 min	* 5,1 min

Fáze 4, 8 a 9 byly prováděny ve všech základních elektrolytech stejně.

fáze 4 (dávkování zóny markeru): 20 mbar \* 0,2 min

fáze 8 a 9 (aplikace tlaku): 40 mbar

poznámka: Veličiny jsou uváděny v jednotkách, ve kterých byly zadávány do ovládacího programu elektroforézy.

Po vložení napětí (fáze 7) se obsah kapiláry začne pohybovat směrem ke katodě elektroosmotickým tokem. Rychlost EOF je po celé délce kapiláry konstantní a proto se jeho působením nemění vzdálenost mezi zónou markeru a zónou analytu.

Kladně nabitý analyt migruje roztokem směrem ke katodě a pouze tato migrace mění vzájemnou vzdálenost analytu a markeru. Protože zónu markeru (thiomočoviny) obklopuje BGE bez micel, nemůže docházet k interakci thiomočoviny s micelami a k její mobilizaci.

Napětí je aplikováno tak dlouho, aby analyt urazil přes roztok právě vzdálenost  $d$ , takže výsledná vzdálenost obou zón je stejná jako vzdálenost vodivostního a UV detektoru ( $L_D$ ). Při následné aplikaci tlaku (fáze 8) pak projde zóna analytu UV detektorem současně s průchodem zóny markeru vodivostním detektorem.

#### *Princip metody – reálný případ*

Při reálném experimentu není možné ve fázi 4 nadávkovat vzorek markeru zcela současně s průchodem zóny vzorku vodivostním detektorem, vzájemná vzdálenost zóny vzorku a zóny markeru se od ideální vzdálenosti  $L_0$  bude lišit o  $L_{inj}$ , jak je naznačeno na Obrázek 2a.

Stejně tak nebude ve fázi 8 průchod zóny markeru vodivostním detektorem zcela současně s průchodem zóny analytu UV detektorem. V reálném experimentu nebude po skončení aplikace napětí vzdálenost zóny analytu a zóny markeru rovna právě  $L_D$  – ať už v důsledku toho, že původní vzdálenost obou zón nebyla přesně  $L_0$ , nebo že během aplikace napětí

neurazil analyt migračním pohybem právě vzdálenost  $d$ , při reálném experimentu dojde v určité míře k obojímu. Vzdálenost obou zón se ve fázi 8 bude lišit od ideální vzdálenosti  $L_D$  o  $L_{pik}$ , jak je naznačeno na Obrázek 2b. Korekční vzdálenosti  $L_{inj}$  i  $L_{pik}$  jsou zavedeny jako kladné pokud je skutečná vzdálenost mezi zónou analytu a zónou markeru delší oproti ideálnímu případu.

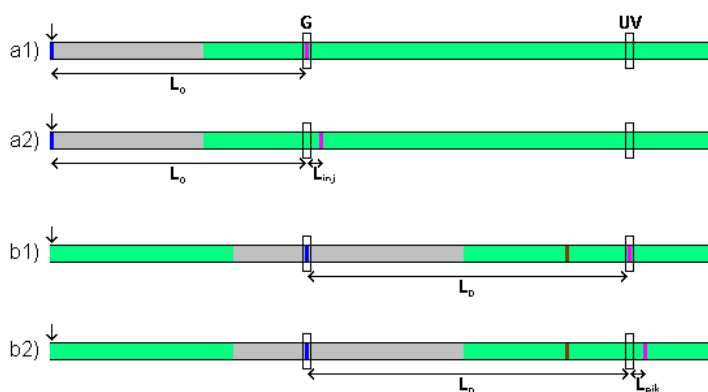
Aby byla zachována přesnost metody, je nutné velikost odchylek od ideálního případu  $L_{inj}$  a  $L_{pik}$  kvantifikovat a zohlednit je ve výpočtu mobility analytu.

Tyto odchylky se projeví a jsou zaznamenány ve fázích 4 a 8, kdy se obsah kapiláry pohybuje pouze působením tlaku. Rychlost protlačování lze stanovit na základě doby, za kterou zóna markeru urazí vzdálenost mezi vodivostním a UV detektorem (fáze 9).

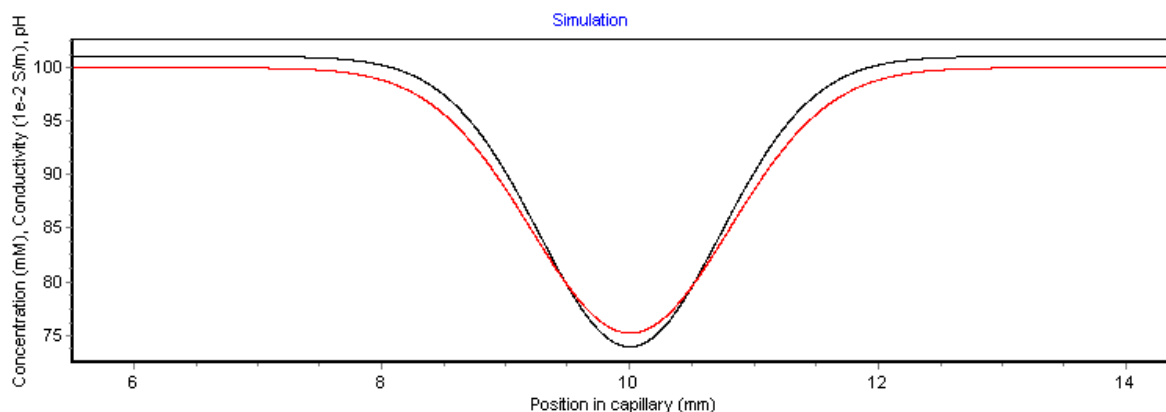
Ze známé rychlosti protlačování je možné spočítat velikost korekcí  $L_{inj}$  (z pozice píku analytu na záznamu odezvy vodivostního detektoru a ze znalosti okamžiku dávkování zóny markeru) a  $L_{pik}$  (z poloh píků analytu a markeru na elektroferogramech z UV respektive z vodivostního detektoru).

#### *Předpoklady metody*

Dvoudetektorová metoda je stejně jako metoda Williamse a Vigha [56] založena na předpokladu, že se vzájemná vzdálenost analytu a markeru mění pouze v důsledku migrace analytu. To je splněno, pokud je během aplikace napětí rychlost EOF konstantní po celé délce kapiláry. Jak bylo řečeno v úvodu (kapitola 1.3), v nehomogenně naplněné kapiláře (kde  $\zeta$ -potenciál není konstantní po celé délce) dochází ke kombinaci EOF a laminárního toku tak, že celkový tok kapilárou je po celé její délce konstantní.



**Obrázek 2: Dvou detektorová metoda (viz též Obrázek 1 a text); a1) fáze 4 ideální případ; a2) fáze 4 reálný případ; b1) konec fáze 8 ideální případ; b2) konec fáze 8 reálný případ.**



**Obrázek 3: Výstup simulace v programu Simul 5; BGE D00 (viz Tabulka 1), zóna vzorku – čistá voda; délka kapiláry 20 mm, pozice zóny vzorku 10 mm, šířka zóny vzorku 0,5 mm; aplikované napětí 300 V (intenzita pole přibližně stejná jako v experimentech dvoudetektorovou metodou); délka simulovaného experimentu 300 s; simulace provedená se zapnutou korekcí na iontovou sílu; černá – vodivostní profil; červená – koncentrační profil imidazolu.**

Podmínky, za kterých se v nehomogenně naplněné kapiláře vzdálenost zóny analytu od zóny markeru mění pouze v důsledku migrace analytu, jsou uvedeny v kapitole 1.3. Pro experimenty prováděné dvoudetektorovou metodou je lze pokládat za splněné:

- 1) malý vnitřní průměr kapiláry (50  $\mu\text{m}$ );
- 2) délka zóny analytu (2 mm) mnohem větší než poloměr kapiláry (50  $\mu\text{m}$ );
- 3) zóna analytu (2 mm) kratší než zóny BGE, které ji obklopují (minimálně 140 mm);
- 4) analyt musí mít vysoký difúzní koeficient (musí jít o malý iont nebo molekulu).

Dále je pro dvoudetektorovou metodu nutná detekovatelnost zóny analytu i zóny markeru na obou detektorech (jak na vodivostním, tak na UV detektoru). Zóna sodného kationtu byla pozorovatelná na vodivostním detektoru a díky přítomnosti imidazolu v BGE i na UV detektoru prostřednictvím nepřímé detekce (214 nm). Zóna thiomočoviny byla na UV detektoru přímo pozorovatelná (238 nm). Na vodivostním detektoru ale jako neutrální látka nemohla být zaznamenána přímo.

Proto byl jako zóna markeru dávkován roztok thiomočoviny ve vodě (bez dalších složek BGE), který se na vodivostní detekci projevil výrazným negativním píkem. Podle programu Simul 5 měla mít tato zóna (*water gap*) nulovou mobilitu (Obrázek 3) a mohla tedy sloužit jako marker EOF spolu s thiomočovinou.

#### *Délky úseků na kapiláře a zón BGE*

Protože základem pro výpočet mobility analytu je vzdálenost  $d$  (viz dále – rovnice (36) a (38)), musí být její délka dostatečně velká ve srovnání s chybou jejího stanovení.



Z principu metody vyplývá, že celková délka zón  $EM_1$  a  $EF_1$  (vzdálenost mezi zónou analytu a zónou markeru) musí být rovna přibližně  $L_0$  (viz schéma metody na Obrázek 1e). A celková délka  $EF_2$  a  $EM_2$  (vzdálenost o kterou je zóna markeru vtlačena do kapiláry před aplikací napětí, Obrázek 1h) musí být dostatečně krátká, aby do vypnutí napětí (konec fáze 7) zóna analytu nepřešla přes UV detektor a zóna markeru přes vodivostní detektor.

Při aplikaci napětí dochází na rozhraní BGE s micelami a BGE bez micel ke změnám koncentrace všech složek BGE a to na obou stranách tohoto rozhraní. Oblasti s porušeným složením BGE se od rozhraní rozšiřují dále do roztoku, dokud je na kapiláru napětí vloženo. Zóna  $EM_1$  musí být alespoň tak dlouhá, aby zóna analytu nebyla během experimentu zasažena oblastí s porušeným složením BGE a stejně tak musí být dostatečně dlouhé zóny  $EF_1$  a  $EF_2$  obklopující zónu markeru, aby nebyla zasažena ani ta.

### *Stanovení mobility*

Při dvoudetektorové metodě (stejně jako v metodě Williamse a Vigha) je kapilára naplněná základními elektrolyty o různých vodivostech. Intenzita elektrického pole pak není podél kapiláry konstantní a není možné ji spočítat jako podíl vloženého napětí a celkové délky kapiláry.

Analyt se nachází v BGE obsahujícím micely a intenzitu pole v této části kapiláry lze spočítat z proudu procházejícího kapilárou  $I_{het}$  a z vodivosti použitého BGE s micelami  $\kappa_M$ . Efektivní mobilita analytu  $u_{eff}$  se počítá podle stejného vzorce, jako v případě metody Williamse a Vigha [56] (odvození tohoto vztahu je naznačeno v kapitole 1.3):

$$u_{eff} = \frac{L_{mig}}{\int_0^{t_U} E_{het,M}(t) \cdot dt} = \frac{L_{mig} \cdot S \cdot \kappa_M}{\int_0^{t_U} I_{het}(t) \cdot dt} \quad (36)$$

kde  $L_{mig}$  je vzdálenost, kterou analyt urazil přes roztok migračním pohybem;  $S$  průřez kapiláry a  $t_U$  je doba, po kterou bylo na kapiláru vloženo napětí.

Vodivost základních elektrolytů s micelami je nutné stanovit v samostatných experimentech: celá kapilára (o celkové délce  $L_T$ ) je naplněna příslušným BGE. Při vloženém napětí  $U$  se odečte proud  $I_{hom}$  procházející touto homogenně naplněnou kapilárou. Vodivost daného BGE se pak vypočte podle vzorce (34) (uveden v kapitole 1.3):

$$\kappa_M = \frac{I_{hom} \cdot L_T}{S \cdot U} \quad (34)$$

Jak pro výpočet efektivní mobility analytu (36) tak vodivosti BGE (34) je nutná znalost proudu procházejícího kapilárou ( $I_{het}$  respektive  $I_{hom}$ ). Přístroj pro kapilární elektroforézu ale neměří hodnotu procházejícího proudu zcela přesně. Tuto nepřesnost lze vyhodnotit v samostatných experimentech, kdy je za kapiláru zapojen vnější multimetr, a pak proud korigovat. Ve výpočtech podle rovnic (36) a (34) se pak používá tento korigovaný proud namísto proudu udávaného přístrojem.

Vzdálenost, kterou analyt při dvoudetektorové metodě urazil migračním pohybem přes roztok  $L_{mig}$ , je pro ideální případ rovna vzdálenosti  $d = L_D - L_0$ . V reálném případě je vzdálenost  $L_{mig}$  dána vztahem:

$$L_{mig} = d + L_{pik} - L_{inj} = L_D - L_0 + L_{pik} - L_{inj} = L_{UV} - 2L_0 + L_{pik} - L_{inj} \quad (38)$$

kde  $L_D$  je vzdálenost mezi vodivostním a UV detektorem,  $L_0$  vzdálenost od začátku kapiláry k vodivostnímu detektoru a  $L_{UV}$  vzdálenost od začátku kapiláry k UV detektoru,  $L_{inj}$  a  $L_{pik}$  korekční vzdálenosti znázorněné na Obrázek 2.

Vzdálenosti  $L_0$  a  $L_{UV}$  jsou dány experimentálním uspořádáním (konkrétním umístěním kapiláry v detektorech).  $L_{UV}$  se stejně jako celková délka kapiláry změří přímo (například pravítkem).  $L_0$  takto změřit nelze (vodivostní detektor zakrývá přibližně 1 cm kapiláry, což znemožňuje přímé určení pozice jeho detekčního místa), tato vzdálenost se stanoví v samostatných experimentech založených na protlačování vhodného vzorku kapilárou (viz odstavec *Určení geometrie*).

Korekční vzdálenosti  $L_{inj}$  a  $L_{pik}$  se liší pro každý jednotlivý experiment a určí se na základě rychlosti protlačování při konkrétním měření. Tento výpočet lze provést několika způsoby, které se liší náročností. V této práci jsme použili následující způsoby zpracování dat a posoudili vliv jednotlivých zjednodušení na stanovenou hodnotu mobility.

Rychlost protlačování lze definovat vzhledem k časovému intervalu  $v_{p,t}$  (39), nebo k integrálu časového záznamu průběhu tlaku  $v_{p,pt}$  (40):

$$v_{p,t} = \frac{L_D}{(t_{M,UV} - t_{M,G})} \quad (39)$$

$$v_{p,pt} = \frac{L_D}{\int_{t_{M,G}}^{t_{M,UV}} p(t)dt} \quad (40)$$

kde  $t_{M,UV}$  je čas, kdy je zóna markeru zaznamenána UV detektorem,  $t_{M,G}$  čas, kdy je zaznamenána vodivostním detektorem (fáze 9 dvoudetektorové metody),  $p$  je tlak aplikovaný na kapiláru.

Rychlost  $v_{p,pt}$  lze pokládat za přesnější, protože zohledňuje fluktuace tlaku během experimentu. Naproti tomu při používání rychlosti  $v_{p,t}$  se předpokládá, že tlak aplikovaný na kapiláru je během celého experimentu konstantní a roven hodnotě zadané do ovládacího programu elektroforézy  $p_{inst}$  (kromě fází, kdy se dávákuje zóna analytu, zóna markeru a kdy se aplikuje napětí), což je v rozporu s praxí.

Korekční vzdálenost  $L_{pik}$  lze počítat následujícími způsoby:

$$^a L_{pik} = v_{p,pt} \cdot \int_{t_{A,UV}}^{t_{M,G}} p(t)dt \quad (41)$$

$$^b L_{pik} = \frac{v_{p,t}}{p_{inst}} \cdot \int_{t_{A,UV}}^{t_{M,G}} p(t)dt \quad (42)$$

$$^q L_{pik} = v_{p,t} \cdot (t_{A,UV} - t_{M,G}) \quad (43)$$

kde  $t_{M,G}$  je čas, kdy je vodivostním detektorem zaznamenána zóna markeru, a  $t_{A,UV}$  čas, kdy je UV detektorem zaznamenána zóna analytu. Pokud zóna analytu projde UV detektorem dříve než zóna markeru detektorem vodivostním, je skutečná vzdálenost mezi oběma zónami menší než  $L_0$  a hodnota  $L_{pik}$  je záporná.

Korekční vzdálenost  $L_{inj}$  lze počítat následujícími způsoby:

$$^a L_{inj} = v_{p,pt} \cdot \left( \int_{t_{A,G}}^{t_{M,in}} p(t)dt - \int_{spike} p(t)dt \right); \quad \int_{spike} p(t)dt = A_{spike} \quad (44)$$

$$^b L_{inj} = \frac{v_{p,t}}{p_{inst}} \cdot \left( \int_{t_{A,G}}^{t_{M,in}} p(t)dt - A_{spike} \right) \quad (45)$$

$${}^c L_{inj} = v_{p,pt} \cdot \int_{t_{A,G}}^{t_{M,in}} p(t) dt \quad (46)$$

$$t_{M,in} = \frac{(t_{M,in2} - t_{M,in1})}{2} \quad (47)$$

kde  $t_{M,in1}$  je čas, kdy se začíná dávkovat zóna markeru do kapiláry;  $t_{M,in2}$  čas, kdy skončí dávkování zóny markeru do kapiláry;  $t_{A,G}$  čas, kdy je zóna analytu zaznamenána vodivostním detektorem;  $A_{spike}$  je artefakt (respektive jeho plocha), který na záznamu tlaku doprovází výměnu vialky na začátku kapiláry, ale není spojen se skutečnou aplikací tlaku na kapiláru a nezpůsobuje tedy pohyb jejího obsahu.

Výpočet korekční vzdálenosti  ${}^q L_{inj}$  bez využití integrace tlaku je komplikovanější:

$$\begin{aligned} {}^q L_{inj} &= v_{p,t} \cdot (t_{M,in} - t_{A,G}) \frac{p_{inj,M}}{p_{inst}} ; & t_{M,in1} < t_{A,G} < t_{M,in2} \\ {}^q L_{inj} &= v_{p,t} \cdot \left[ (t_{thr1} - t_{A,G}) + t_{in,M} \frac{1}{2} \frac{p_{inj,M}}{p_{inst}} \right] ; & t_{A,G} < t_{M,in1} \\ {}^q L_{inj} &= v_{p,t} \cdot \left[ (t_{A,G} - t_{thr2}) + t_{in,M} \frac{1}{2} \frac{p_{inj,M}}{p_{inst}} \right] ; & t_{M,in2} < t_{A,G} \end{aligned} \quad (48)$$

kde  $t_{thr1}$  je čas, kdy se přestává aplikovat  $p_{inst}$  před nadávkováním zóny markeru;  $t_{thr2}$  čas, kdy se začíná aplikovat  $p_{inst}$  po nadávkování zóny markeru;  $p_{inj,M}$  je tlak, který je zadán do ovládacího programu elektroforézy, aby byl aplikován během dávkování zóny markeru.

Výpočty založené na integraci tlaku lze pokládat za přesnější než výpočty používající časové intervaly. Integrace je ale obvykle výrazně náročnějším způsobem zpracování experimentálních dat. Proto bylo při vyhodnocování dat získaných dvoudetektorovou metodou pro výpočet mobility analytu  $u_{eff}$  použito sedm následujících vzorců ((49) až (55), levý horní index čísluje způsoby výpočtu). Oproti způsobu (49), který lze pokládat za nejpřesnější, je v ostatních vztazích vždy použito některé zjednodušení, aby mohl být posouzen jeho vliv na stanovenou hodnotu mobility.

$${}^1 u_{eff} = (d + {}^a L_{pik} - {}^a L_{inj}) \frac{S \cdot \kappa_M}{\int_{t_{U1}}^{t_{U2}} I_{het}(t) dt} \quad (49)$$

Tento způsob výpočtu lze pokládat za nejpřesnější (i rychlost protlačování i obě korekční vzdálenosti se počítají pomocí integrace záznamu tlaku).

$${}^2u_{eff} = \left( d + {}^aL_{pik} - {}^qL_{inj} \right) \frac{S \cdot \kappa_M}{\int_{t_{U1}}^{t_{U2}} I_{het}(t) dt} \quad (50)$$

${}^aL_{pik}$  je vypočtena nejpřesnějším uvažovaným způsobem a  ${}^qL_{inj}$  je vypočtena podle časových intervalů a za předpokladu konstantních tlaků  $p_{inst}$  a  $p_{inj,M}$ .

$${}^3u_{eff} = \left( d + {}^qL_{pik} - {}^aL_{inj} \right) \frac{S \cdot \kappa_M}{\int_{t_{U1}}^{t_{U2}} I_{het}(t) dt} \quad (51)$$

${}^qL_{pik}$  je vypočtena podle časových intervalů a  ${}^aL_{inj}$  je vypočtena nejpřesnějším uvažovaným způsobem.

$${}^4u_{eff} = \left( d + {}^qL_{pik} - {}^qL_{inj} \right) \frac{S \cdot \kappa_M}{\int_{t_{U1}}^{t_{U2}} I_{het}(t) dt} \quad (52)$$

${}^qL_{pik}$  i  ${}^qL_{inj}$  jsou vypočtené pomocí časových intervalů (tento způsob výpočtu byl zahrnut pro případ, že by se při stejném způsobu výpočtu obou korekcí navzájem odečetly některé nepříznivé efekty).

$${}^5u_{eff} = \left( d + {}^aL_{pik} - {}^cL_{inj} \right) \frac{S \cdot \kappa_M}{\int_{t_{U1}}^{t_{U2}} I_{het}(t) dt} \quad (53)$$

${}^aL_{pik}$  je vypočtena nejpřesnějším uvažovaným způsobem a výpočet  ${}^cL_{inj}$  zanedbává vliv artefaktu  $A_{spike}$  doprovázejícího výměnu vialky.

$${}^6u_{eff} = \left( d + {}^bL_{pik} - {}^bL_{inj} \right) \frac{S \cdot \kappa_M}{\int_{t_{U1}}^{t_{U2}} I_{het}(t) dt} \quad (54)$$

${}^bL_{pik}$  i  ${}^bL_{inj}$  jsou spočtené z integrace tlaku, ale s použitím rychlosti protlačování  $v_{p,t}$  stanovené pomocí časového intervalu.

$${}^7u_{eff} = \left( d + {}^aL_{pik} - {}^aL_{inj} \right) \frac{S \cdot \kappa_M^{inst}}{\int_{t_{U1}}^{t_{U2}} I_{het,inst}(t) dt} \quad (55)$$

Pro výpočet se použije nekorigovaný proud  $I_{het,inst}$  procházející nehomogenně naplněnou kapilárou a vodivost BGE s micelami  $\kappa_M^{inst}$  je vypočtená také s použitím nekorigovaného proudu.

$t_{U1}$  a  $t_{U2}$  ohraničují časový interval, kdy je na kapiláru vloženo napětí, a  $I_{het}$  je korigovaný proud procházející heterogenně naplněnou kapilárou.

## b) Výsledky dvoudetektorové metody

### Korekce proudu udávaného přístrojem

Přístroj pro kapilární elektroforézu (dále jen *elektroforéza*) neměří hodnotu proudu procházejícího kapilárou při elektroforetickém experimentu zcela přesně. Na základě porovnání proudu udávaného elektroforézou s hodnotami naměřenými vnějším multimetrem byla stanovena potřebná korekce. Měření proudu byla prováděna v 10 mM a 40 mM roztoku KCl a jejich výsledky jsou uvedeny v tabulce 6.

**Tabulka 6: Proudý udávané připojeným multimetrem a přístrojem pro kapilární elektroforézu při napětí  $U$  vloženém na kapiláru.**

$U$ /kV	$I_{met}$ /μA	$I_{inst}$ /μA
0,1	0,08	0,29 <sup>a</sup>
2,0	5,26	5,5 <sup>b</sup>
4,0	10,67	10,9 <sup>b</sup>
8,0	21,94	22,1 <sup>b</sup>
12,0	34,1	34,4 <sup>b</sup>
16,0	47,9	48,1 <sup>b</sup>
20,0	63,9	64,2 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> kapilára naplněna 10 mM roztokem KCl

<sup>b</sup> kapilára naplněna 40 mM roztokem KCl

**Tabulka 7: Délka jednotlivých úseků na kapiláře používané při měřeních dvoudetektorovou metodou.**

úsek	/cm
$L_T$	99,3
$L_{UV}$	90,8
$L_0$	38,0
$L_D = L_{UV} - L_0$	52,8
$d = L_D - L_0 = L_{UV} - 2 L_0$	14,9

Hodnoty proudu procházejícího kapilárou při daném napětí změřené připojeným multimetrem  $I_{met}$  byly vyneseny proti proudu udávanému elektroforézou  $I_{inst}$  a získaná závislost byla proložena lineární funkcí:

$$I_{met} = A + B \cdot I_{inst} \quad (56)$$

Směrnice lineární závislosti  $B$  se v rámci experimentální chyby nelišila od jedné, hodnota úseku  $A$  byla  $-0,212 \mu A$ .

Proto byl při vyhodnocování experimentů prováděných dvoudetektorovou metodou proud udávaný elektroforézou  $I_{inst}$  korigován odečtením konstanty  $b_{cor} = 0,212 \mu A$ :

$$I_{cor} = I_{inst} - b_{cor} \quad (57)$$

Podle rovnice (57) byl počítán jak korigovaný proud procházející homogenně naplněnou kapilárou při stanovování vodivosti BGE (34), tak korigovaný proud procházející heterogenně naplněnou kapilárou při výpočtech mobilit (49) až (54).

### Určení geometrie

Konstrukce bezkontaktního vodivostního detektoru a kazety, ve které je při experimentech umístěna kapilára, neumožňuje přímo (například pravítkem) přesně změřit vzdálenost detekčního místa vodivostního detektoru od začátku kapiláry ( $L_0$ ). Na základě známé

vzdálenosti UV detektoru od začátku kapiláry ( $L_{UV}$ ) byla vzdálenost vodivostního detektoru od začátku kapiláry ( $L_0$ ) stanovena metodou popsanou v publikaci [4] v samostatných experimentech. Vodou naplněnou kapilárou byl protlačen vzorek, jehož průchod byl zaznamenán oběma detektory. Vzdálenost  $L_0$  pak byla spočtena ze vzorce:

$$L_0 = \frac{L_{UV} \cdot \int_0^{t_G} p(t) dt}{\int_0^{t_{UV}} p(t) dt} \quad (58)$$

kde  $t_G$  a  $t_{UV}$  jsou časy průchodu vzorku vodivostním respektive UV detektorem,  $p$  je tlak aplikovaný na začátek kapiláry.

Stanovená délka  $L_0$  byla  $(38,0 \pm 0,01)$  cm. Délky všech definovaných úseků na kapiláře jsou uvedeny v Tabulka 7.

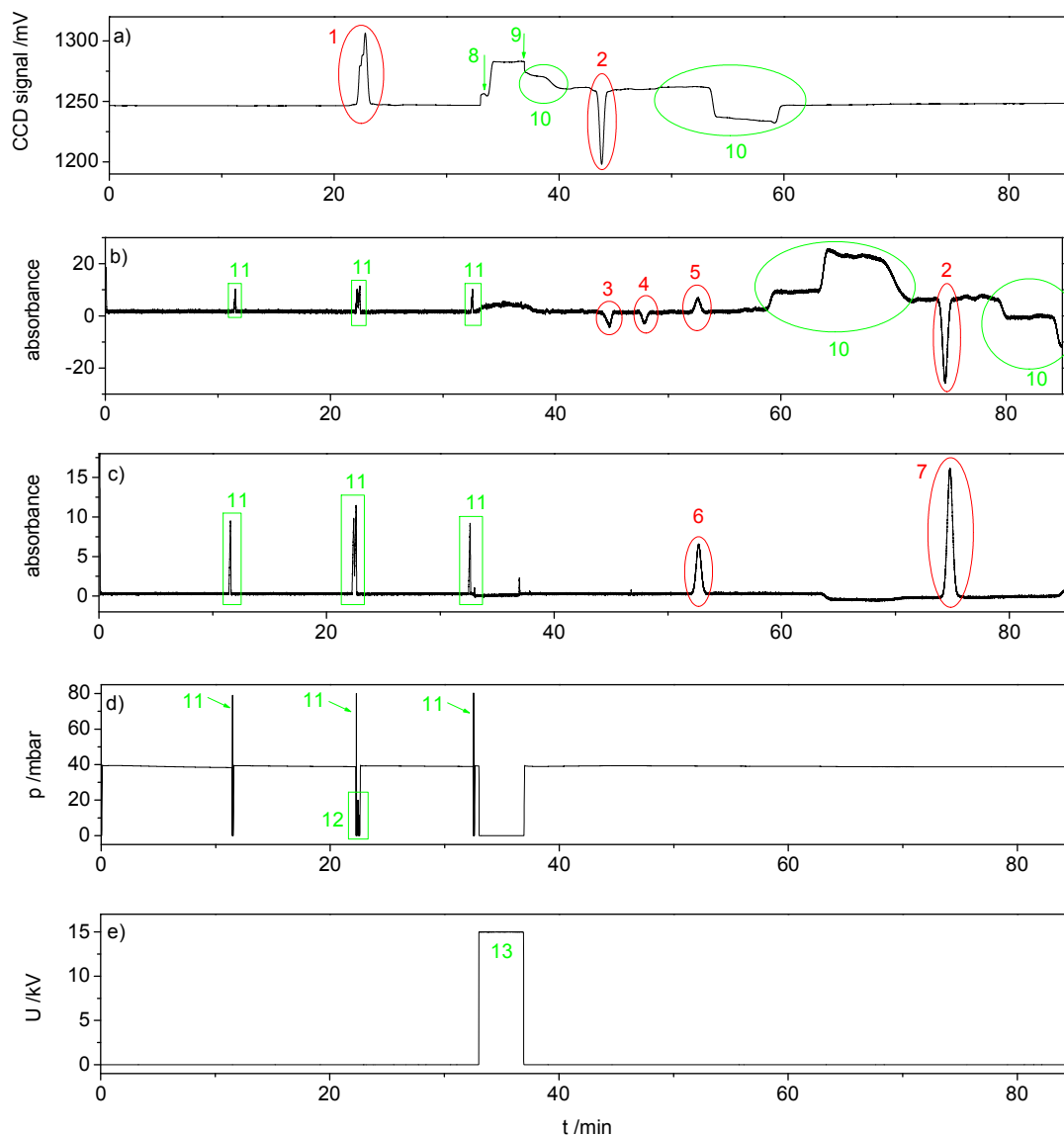
Určení vzdálenosti  $L_0$ , které je klíčové pro stanovení mobility dvoudetektorovou metodou, je tedy také založeno na mobilizaci obsahu kapiláry pomocí tlaku. Stanovení se ale provádí v samostatných experimentech a dostatečným počtem měření lze dosáhnout velké preciznosti.

#### *Interpretace elektroferogramu při dvoudetektorové metodě*

Na Obrázek 4 je typický záznam experimentu provedeného dvoudetektorovou metodou.

Na záznamu z vodivostního detektoru (Obrázek 4a) je vyznačen průchod zóny vzorku před aplikací napětí (číslo 1) a systémové zóny v BGE bez micel (*water gap*) (číslo 2). Aplikace napětí je provázena ohřátím roztoku v kapiláře, což se projeví prudkým nárůstem odezvy vodivostního detektoru (číslo 8). Po vypnutí napětí odezva opět poklesne (číslo 9). Na záznamu jsou také vyznačené disturbance kolem rozhraní BGE s micelami a BGE bez micel (číslo 10).

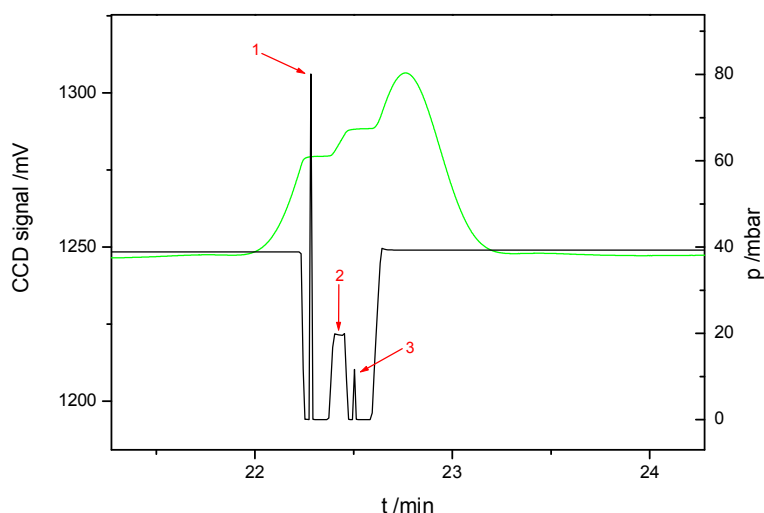
Záznam z UV detektoru je uveden na Obrázek 4b při 214 nm (nepřímá detekce) a Obrázek 4c při 238 nm. Na nepřímé detekci (214 nm) je viditelný pík analytu (číslo 3), systémové píky v BGE s micelami (čísla 4 a 5 – ověřeno programem PeakMaster) a systémová zóna (*water-gap*) v BGE bez micel (číslo 2). Systémový pík označený číslem 5 ve skutečnosti odpovídá dvěma systémovým zónám (pro které PeakMaster v micelárním módu předpovídá nulovou a malou zápornou mobilitu), k jejich viditelnému rozdělení nedojde, protože napětí je aplikováno po příliš krátkou dobu. Stejně jako na vodivostní detekci jsou i na detekci nepřímé viditelné disturbance u rozhraní obou BGE (číslo 10).



**Obrázek 4: Záznam experimentu dvoudetektorovou metodou. BGE obsahující micely D10, BGE bez micel D00 (viz Tabulka 1), vzorek obsahoval 40 mM NaCl, 1 mM TU a složky BGE, marker 4 mM thiomočovina ve vodě; parametry experimentu viz Tabulka 5; a) odezva vodivostního detektoru, b) odezva UV detektoru 214 nm (imidazol – nepřímá detekce), c) odezva UV detektoru 238 nm (thiomočovina), d) tlak, e) vložené napětí; 1 – zóna vzorku (před aplikací napětí), 2 – zóna markeru (*water gap*), 3 – zóna analytu (po aplikaci napětí), 4 – kationtový systémový pík, 5 – systémové píky blízké nule, 6 – thiomočovina dávkovaná společně s analytem, 7 – zóna markeru (thiomočovina), 8 – nárůst odezvy vodivostního detektoru při vložení napětí, 9 – pokles odezvy vodivostního detektoru při vypnutí napětí; 10 – disturbance kolem rozhraní obou BGE, 11 – efekt doprovázející výměnu zásobních vialek na začátku kapiláry, 12 – dávkování zóny markeru, 13 – aplikace napětí.**

Při 238 nm poskytuje odezvu pouze thiomočovina. Pík označený číslem 6 přísluší thiomočovině dávkované ve vzorku společně s analytem (nebyla použita jako marker, ale sloužila pouze k usnadnění orientace ve výsledném elektroferogramu), druhý pík (číslo 7) přísluší thiomočovině dávkované ve fázi 4, která sloužila jako marker.





**Obrázek 5:** Detail dávkování (fáze 4 dvoudetektorové metody), stejný experiment jako na Obrázek 4; zelená – odezva vodivostního detektoru (zóna vzorku), černá – tlak; 1 – efekt spojený s výměnou zásobní vialky s FE na začátku kapiláry za vialku s roztokem thiomocoviny, 2 – dávkování zóny markeru, 3 – efekt spojený s výměnou vialky s roztokem thiomocoviny za zásobní vialku s FE.

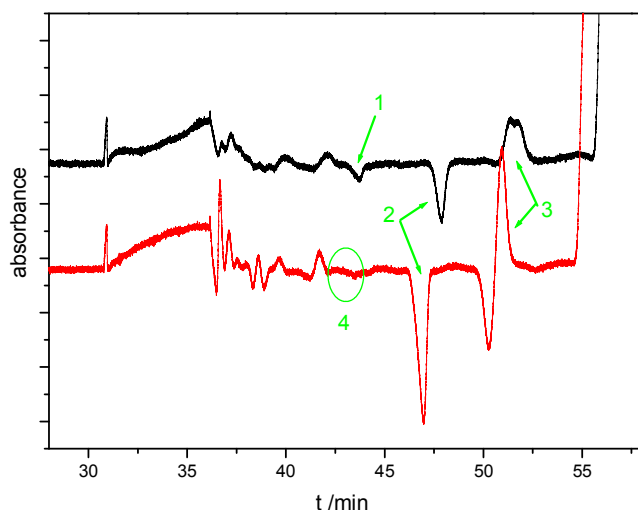
Při obou vlnových délkách jsou na elektroferogramu patrné artefakty doprovázející výměnu vialky na začátku kapiláry (číslo 11).

Artefakty spojené s výměnou vialky jsou i na záznamu tlaku (Obrázek 4d). Zde je také vyznačené dávkování zóny markeru (číslo 12). Na Obrázek 4e je pak záznam napětí vkládaného na kapiláru.

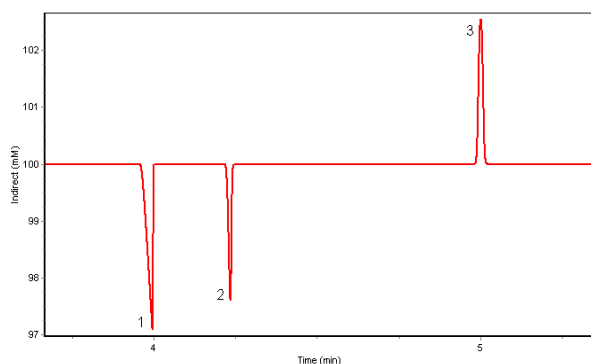
Na Obrázek 5 je vidět, že pík odpovídající zóně vzorku zaznamenaný vodivostním detektorem je deformovaný (z levé strany „stupňovitý“). Začátek zóny vzorku prochází vodivostním detektorem současně s dávkováním zóny markeru (fáze 4). Před a po nadávkování se mění zásobní vialka na začátku kapiláry. Během této výměny se na kapiláru neaplikuje tlak, obsah kapiláry se nepohybuje a odezva detektoru je konstantní – to se projeví jako „schod“ na náběžné hraně píku. Tyto „schody“ jsou tedy pouze artefakty, v kapiláře je tvar (koncentrační profil) zóny analytu gaussovský.

#### *Identifikace píku analytu*

Na Obrázek 6 je příklad identifikace píku analytu na základě porovnání s experimentem, při kterém byl použit slepý vzorek. Rozdíl v polohách systémových píků na časové ose je způsoben různou průměrnou rychlostí EOF při obou experimentech. Přesto bylo možné identifikovat pík analytu (číslo 1) jako pík chybějící na záznamu experimentu se slepým vzorkem (číslo 4).



**Obrázek 6:** Záznam dvou experimentů dvoudetektorovou metodou (detail); BGE obsahující micely D70; BGE bez micel D00 (viz Tabulka 1); černá – vzorek obsahoval 40 mM NaCl, 1 mM thiomočovinu a složky BGE; červená – vzorek obsahoval 1 mM thiomočovinu a složky BGE (slepý vzorek); 1 – pík analytu;; 2 – kationický systémový pík; 3 – systémové píky blízke nule; 4 – chybějící pík analytu v experimentu se slepým vzorkem.



**Obrázek 7:** Elektroferogram nasimulovaný programem PeakMaster (výřez); BGE D70 (viz Tabulka 1); zóna vzorku obsahovala 40 mM NaCl a složky BGE; zapnutá korekce na iontovou sílu; 1 – sodný kationt; 2 – kationtový systémový pík; 3 – systémové píky blízke nule.

Současně byl v programu PeakMaster nasimulován elektroferogram separace se stejným složením BGE i zóny vzorku jako v případě experimentu dvoudetektorovou metodou (Obrázek 7). Tento program nezohledňuje formaci micel v BGE, takže absolutní hodnoty jím vypočtených mobilit se nemusejí zcela shodovat s experimentem, ale pořadí a orientace píků se shoduje.

#### *Porovnání různých způsobů výpočtu mobility*

Pro každý experiment byla mobilita sodného kationtu spočtena podle rovnic (49) až (55). Z výsledků získaných stejným typem výpočtu při daném složení BGE byl vypočten průměr a

směrodatná odchylka. Jejich porovnání bylo obdobné pro všechny použité koncentrace, pro BGE s koncentracemi LiDS 30 mM a 50 mM je uvedeno v Graf 1.

Nejpřesnějším uvažovaným způsobem jsou spočteny mobility  ${}^1u_{eff}$  (49). Ve výpočtech mobilit  ${}^2u_{eff}$  (50) až  ${}^6u_{eff}$  (54) je při stanovování korekčních vzdáleností  $L_{pik}$  a  $L_{inj}$  (viz *Princip metody – reálný případ*) integrace tlaku do různé míry nahrazena použitím časových intervalů za předpokladu konstantního aplikovaného tlaku. Ve výpočtu  ${}^7u_{eff}$  (55) jsou použity nekorigované proudy udávané elektroforézou namísto proudů korigovaných podle rovnice (57).

Žádný z porovnávaných způsobů výpočtu se od nejpřesnějšího uvažovaného v rámci experimentální chyby významně neliší. Výsledky výpočtů, v nichž se používá korekční vzdálenost  ${}^9L_{inj}$  (48) spočtená pomocí časových intervalů ( ${}^2u_{eff}$  a  ${}^4u_{eff}$ ), se od ostatních způsobů odlišují pozorovatelně, ale rozdíl je stále menší než experimentální chyba.

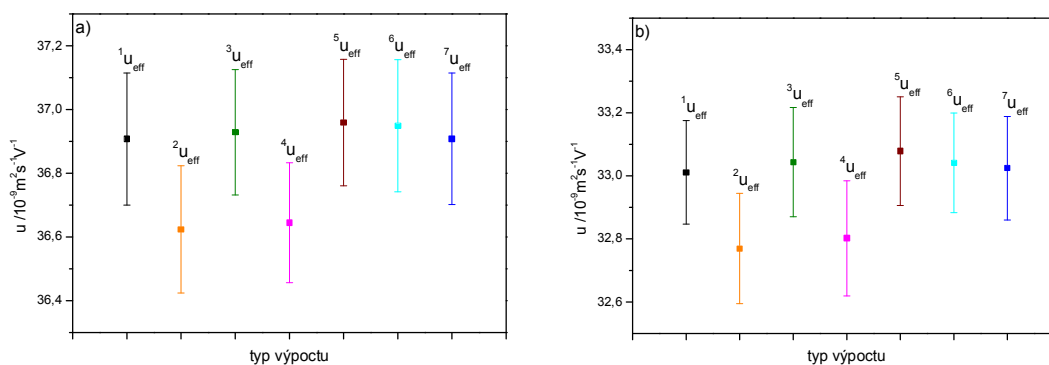
Při výpočtu mobility stanovené dvoudetektorovou metodou je tedy možné použít tato zjednodušení:

- 1) počítat s nekorigovanými proudy udávanými elektroforézou  $I_{inst}$ ;
- 2) pro stanovení korekčních vzdáleností použít rychlost protlačování  $v_{p,t}$  vypočtenou z časových intervalů;
- 3) korekční vzdálenost  $L_{pik}$  počítat z časového intervalu;
- 4) při výpočtu  $L_{inj}$  neodečítat plochu artefaktu provázejícího výměnu vialky na začátku kapiláry  $A_{spike}$  (jeho vliv na stanovenou hodnotu mobility je zanedbatelný).

Korekční vzdálenost  $L_{inj}$  je také v principu možné počítat z časových intervalů, ale výpočet pomocí integrace tlaku je vhodnější.

Korekce proudu procházejícího kapilárou  $b_{cor}$  je ve srovnání s absolutními hodnotami proudu v experimentech prováděných dvoudetektorovou metodou velmi malá (kolem jednoho procenta). Pro velmi malé proudy by ale mohla být významná. Měření při velmi nízkých proudech však nejsou v elektroforetické praxi běžná.

Dále jsou v této práci uváděny mobility spočtené nejpřesnějším uvažovaným způsobem (49).



**Graf 1: Mobility (průměry a směrodatné odchylky) sodného kationtu stanovené dvoudetektorovou metodou v BGE a) D30 (30 mM LiDS), b) D50 (50 mM LiDS), složení BGE viz Tabulka 1; výsledky pro různé způsoby výpočtu:  $^1u_{eff}$  – rovnice (49);  $^2u_{eff}$  – (50);  $^3u_{eff}$  – (51);  $^4u_{eff}$  – (52);  $^5u_{eff}$  – (53);  $^6u_{eff}$  – (54);  $^7u_{eff}$  – (55).**

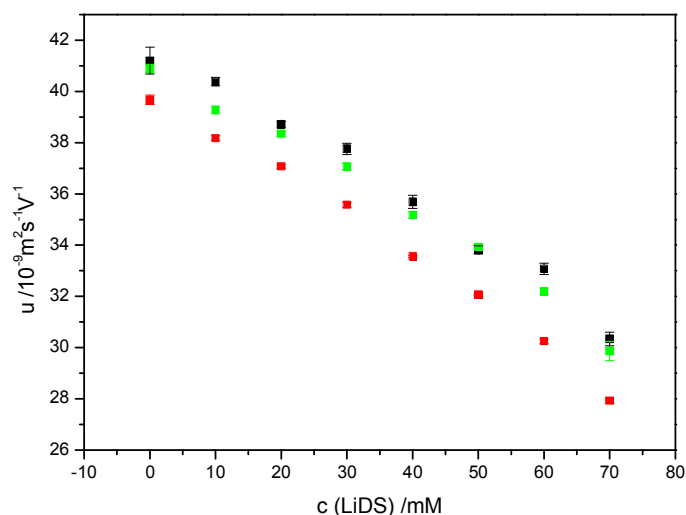
#### *Mobility stanovené dvou detektorovou metodou*

Mobility sodného kationtu stanovené dvoudetektorovou metodou jsou uvedeny v Tabulka 8. V Graf 2 je pak srovnání těchto hodnot s mobilitami stanovenými v téže kapiláře klasickými elektroforetickými experimenty s využitím systémového píku, nebo thiomochoviny pro stanovení rychlosti EOF.

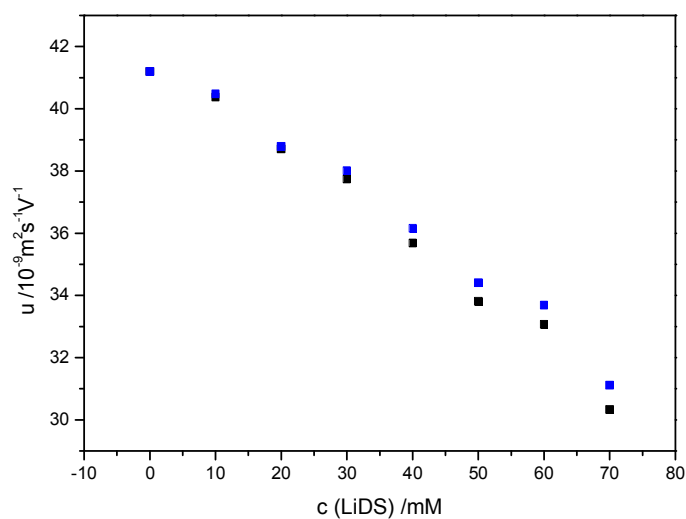
Z tohoto porovnání lze usoudit, že thiomochovina s micelami významně neinteraguje (mobility stanovené klasicky proti thiomochovině jsou velmi blízké těm, stanoveným dvoudetektorovou metodou), zatímco systémový pík má velmi malou kladnou mobilitu (proti němu stanovené mobility jsou nižší ve srovnání s dvoudetektorovou metodou).

**Tabulka 8: Mobility sodného kationtu stanovené dvoudetektorovou metodou (složení BGE viz Tabulka 1).**

základní elektrolyt	c(LiDS) /mM	$u_{eff}(\text{Na}^+)$ / $10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$
D00	0	41,2 ± 0,52
D10	10	40,4 ± 0,16
D20	20	38,7 ± 0,11
D30	30	37,8 ± 0,22
D40	40	35,7 ± 0,26
D50	50	33,8 ± 0,16
D60	60	33,1 ± 0,22
D70	70	30,3 ± 0,26



**Graf 2: Mobility sodného kationtu (složení BGE viz Tabulka 1); černá – mobility (a jejich směrodatné odchylky) stanovené dvoudetektorovou metodou; červená – mobility stanovené klasicky se systémovým píkem jako markerem EOF; zelená – mobility stanovené klasicky s thiomocovinou jako markerem EOF; (relativní směrodatné odchylky mobilit stanovených klasicky nepřesahovaly 0,5 %).**



**Graf 3: Mobility sodného kationtu stanovené dvoudetektorovou metodou (podmínky stejné jako u Graf 2); černá – původní; modrá – viskozitně korigované (viz text).**

#### *Zohlednění viskozity BGE*

V Graf 3 jsou vyneseny mobility korigované na viskozitu podle vzorce (9) pomocí viskozitního poměru (viz kapitolu 1.1). Referenčním roztokem byl BGE D00, který neobsahoval LiDS. Viskozity použitých BGE byly stanoveny pomocí přístroje pro kapilární

elektroforézu a vzájemně se příliš nelišily (rozdíl mezi BGE bez LiDS (D00) a BGE se 70 mM LiDS (D70) byl menší než 3 %). Vliv rozdílů ve viskozitě jednotlivých BGE na průběh závislosti mobility sodného kationtu na koncentraci LiDS je minimální.

### *Shrnutí*

Dvoudetektorová metoda umožňuje stanovit mobilitu v interagujícím systému s použitím komerčně dostupné instrumentace. Metoda zabraňuje interakci neutrálního markeru s interagující složkou BGE tím, že zóna markeru je obklopena základním elektrolytem bez této složky. Výsledky metody také nejsou ovlivněny případnými fluktuacemi rychlosti EOF během experimentu.

Z porovnání různých způsobů vyhodnocení experimentálních dat získaných touto metodou vyplývá, že při proudech běžně používaných v elektroforéze není třeba jejich hodnoty udávané přístrojem pro kapilární elektroforézu korigovat. Rychlost protlačování a korekční vzdálenost  $L_{pik}$  (viz *Princip metody – reálný případ*) není nutné počítat pomocí integrace záznamu tlaku. Zatímco integraci je vhodné použít při výpočtu korekční vzdálenosti  $L_{inj}$ .

Z měření mobility sodného kationtu touto metodou vyplývá, že thiomocovina je vhodným EOF markerem v BGE obsahujících micely dodecylsulfátu lithného. Systémový pík blízko nule má ve zde použitých BGE velmi malou kladnou mobilitu, což sice mírně ovlivňuje absolutní hodnotu stanovených mobilit, ale má jen malý vliv na tvar závislosti mobility na koncentraci LiDS v BGE.

## 4.2. Stanovování viskozity pomocí instrumentace pro kapilární elektroforézu

Popsaná dvoudetektorová metoda, stejně jako metoda Williamse a Vigha [56], využívá mobilizaci obsahu kapiláry působením tlaku. Experimenty založené na aplikaci tlaku se také využívají při určení polohy detektorů na kapiláře [4] nebo při určování viskozity BGE. Fungování takových metod je pak do jisté míry závislé na spolehlivosti a dobré reprodukovatelnosti pohybu roztoku kapilárou v důsledku aplikace tlaku.

Cílem měření rozebíraných v této kapitole bylo ověřit vliv experimentálních faktorů na výsledky experimentů, při nichž je roztok protlačován kapilárou, a také posoudit vliv způsobu zpracování experimentálních dat (viz Tabulka 9).

Pokud je kapalina v kapiláře o vnitřním průměru  $d_{kap}$  a celkové délce  $L_T$  protlačena přes kapiláru působením konstantního tlaku  $p$  na vzdálenost  $\Delta L$  za časový interval  $\Delta t$ , lze viskozitu kapaliny  $\eta$  určit ze vztahu:

$$\eta = \frac{d_{kap}^2 \cdot p \cdot \Delta t}{32 \cdot \Delta L \cdot L_T} \quad (59)$$

V přístroji pro kapilární elektroforézu ale hodnota aplikovaného tlaku během měření kolísá. V takovém případě je možné určovat viskozitu pomocí integrace záznamu tlaku aplikovaného na roztok v kapiláře během experimentu:

$$\eta = \frac{d_{kap}^2 \int_{t_{p1}}^{t_{p2}} p(t) dt}{32 \cdot \Delta L \cdot L_T} \quad (60)$$

kde  $t_{p1}$  a  $t_{p2}$  jsou meze časového intervalu  $\Delta t$ .

Byly porovnávány viskozity dvou roztoků stanovené pomocí instrumentace pro kapilární elektroforézu. Složení obou roztoků je uvedeno v Tabulka 9 a je stejné, jako složení dvou ze základních elektrolytů používaných při měření mobilit kationtů v BGE o koncentraci LiDS 0 až 100 mM (kapitola 4.3). Roztok 1 obsahoval detergent v silně nadmicelární koncentraci, roztok 2 detergent neobsahoval. Viskozita byla stanovována ve dvou kapilárách (vnitřní průměr 50 respektive 25  $\mu\text{m}$ ). Dále byl ověřován vliv aplikace napětí na kapiláru před experimentem (v polovině experimentů se po propláchnutí na kapiláru krátce aplikovalo napětí a po jeho vypnutí bylo provedeno vlastní měření viskozity).

Kapilára je při elektroforéze umístěna v kazetě, v níž začátek a konec kapiláry nejsou termostatovány. Protože viskozita roztoků závisí na teplotě, mohl by mít poměr délek termostatované a netermostované části kapiláry vliv na stanovenou viskozitu. Proto byla viskozita počítána ze tří různých intervalů na kapiláře (popsaných v Tabulka 9), které se poměrem termostatované a netermostované části lišily (nejlépe termostatovaný je úsek mezi oběma detektory, nejhůře úsek od začátku kapiláry k vodivostnímu detektoru).

Viskozita byla počítána podle rovnice (60), která zohledňuje fluktuace tlaku během experimentu, i podle rovnice (59), která předpokládá, že aplikovaný tlak je konstantní.

**Tabulka 9: Faktory, jejichž vliv na viskozitu stanovenou přístrojem pro kapilární elektroforézu se posuzoval (složení roztoků 1 a 2 uvedeno v Tabulka 2).**

faktor		úrovně	
<i>roztok</i>	viskozita kterého roztoku se stanovovala	1	60 mM LiOH; 120 mM MOPS; 100 mM LiDS
		2	160 mM LiOH; 320 mM MOPS
<i>kapilára</i>	vnitřní průměr kapiláry	50 $\mu\text{m}$	
		25 $\mu\text{m}$	
<i>napětí</i>	zda bylo na kapiláru před experimentem vloženo napětí	„U“	vloženo 15 kV po dobu 5 minut
		„P“	napětí nevloženo
<i>výpočet</i>		„t“	pomocí časového intervalu za předpokladu konstantního tlaku – rovnice (59)
		„pt“	pomocí integrace průběhu tlaku během experimentu – rovnice (60)
<i>interval</i>	ze kterého časového intervalu se viskozita stanovovala	„G“	od začátku experimentu do průchodu vzorku vodivostním detektorem
		„UV“	od začátku experimentu do průchodu vzorku UV detektorem
		„det“	od průchodu vzorku vodivostním detektorem do průchodu vzorku UV detektorem

#### *Viskozity – analýza rozptylu*

Na výsledný soubor viskozit byla aplikována analýza rozptylu, přičemž byla posuzována významnost faktorů, které jsou pro přehlednost shrnuty v Tabulka 9.

Výsledky analýzy jsou uvedeny v Tabulka 10 a vyplývá z nich, že faktory významně ovlivňujícími hodnotu stanovené viskozity byly *roztok*, *kapilára* a *napětí*, tedy všechny experimentální faktory. Naopak faktory související s použitým výpočtem (*výpočet* a *interval*) vyšly z analýzy jako nevýznamné.

Pokud jsou ale analyzovány pouze viskozity spočtené pomocí integrálu časového záznamu tlaku (Tabulka 11), jsou významnými faktory pouze *roztok* a *kapilára*, zatímco faktor *napětí* vychází z analýzy rozptylu jako nevýznamný. Možným vysvětlením vlivu napětí na stanovenou hodnotu viskozity by mohly být změny vnitřního povrchu kapiláry v důsledku aplikace napětí před experimentem. Lze říct, že vliv aplikace napětí na stanovenou hodnotu viskozity lze eliminovat použitím výpočtu, který zohledňuje fluktuace tlaku během experimentu (60).

Z každé čtveřice viskozit, které se nelišily v hodnotě žádného z pěti sledovaných faktorů, byla spočtena směrodatná odchylka. Na získaný soubor směrodatných odchylek byla aplikována analýza rozptylu (faktory *kapilára*, *napětí*, *výpočet*, *interval* – Tabulka 12). Cílem této procedury bylo kvantitativně porovnat vliv jednotlivých faktorů na rozptyl stanovených hodnot, jinými slovy na preciznost výsledků.



**Tabulka 10: Výsledky analýzy rozptylu aplikované na viskozity stanovené pomocí instrumentace pro kapilární elektroforézu (viz text).**

faktor	F-poměr	p-hodnota	faktor významný na hladině 5%
<i>roztok</i>	740,00	0,0000	ano
<i>kapilára</i>	2565,00	0,0000	ano
<i>napětí</i>	102,24	0,0000	ano
<i>výpočet</i>	1,22	0,2712	ne
<i>interval</i>	1,52	0,2217	ne

**Tabulka 11: Výsledky analýzy rozptylu aplikované na viskozity stanovené pomocí instrumentace pro kapilární elektroforézu a spočtené podle rovnice (60).**

faktor	F-poměr	p-hodnota	faktor významný na hladině 5%
<i>roztok</i>	1226,10	0,0000	ano
<i>kapilára</i>	4804,14	0,0000	ano
<i>napětí</i>	0,01	0,9293	ne
<i>interval</i>	0,01	0,9876	ne

**Tabulka 12: Výsledky analýzy rozptylu aplikované na směrodatné odchylky viskozit stanovených pomocí instrumentace pro kapilární elektroforézu (viz text).**

faktor	F-poměr	p-hodnota	faktor významný na hladině 5%
<i>kapilára</i>	4,27	0,0499	ano
<i>napětí</i>	2,33	0,1400	ne
<i>výpočet</i>	16,37	0,0005	ano
<i>interval</i>	0,13	0,8761	ne

Výrazný vliv na velikost směrodatné odchylky má ze sledovaných faktorů pouze *výpočet*. Směrodatná odchylka je významně menší, pokud se hodnota viskozity počítá podle rovnice (60), tedy pomocí integrace tlaku. Vliv průměru kapiláry na hodnotu směrodatné odchylky nelze zcela vyloučit, na druhou stranu se ale nejedná o vliv příliš velký (analýza rozptylu určila sice faktor *kapilára* jako významný, ale p-hodnota činila pouze 0,0499 – ležela tedy téměř na zvolené hladině významnosti 5 %).

#### *Viskozity – porovnání s referenční hodnotou*

Pro porovnání byla viskozita obou roztoků stanovena také na průtokovém viskozimetru s fotoelektrickou registrací průtokové doby, zjištěné hodnoty jsou uvedeny v Tabulce 13. Tyto hodnoty lze považovat za referenční. Větší směrodatná odchylka pro první roztok byla způsobena tím, že roztok obsahující detergent pěnil a pěna mírně snižovala přesnost fotoelektrické registrace.

V Tabulce 14 je uvedeno srovnání viskozit stanovených pomocí instrumentace pro kapilární elektroforézu s viskozitami stanovenými průtokovým viskozimetrem pro oba roztoky. Viskozity uvedené v této tabulce byly vypočteny podle rovnice (60) (jsou doprovázeny menší směrodatnou odchylkou) a z úseku mezi vodivostním a UV detektorem.

**Tabulka 13: Viskozity stanovené průtokovým viskozimetrem (složení roztoků uvedeno v Tabulka 2).**

roztok	$\eta$ /10 <sup>-3</sup> m*Pa*s
1	1,112 ± 0,015
2	1,050 ± 0,003

**Tabulka 14: Průměrné viskozity stanovené pomocí instrumentace pro kapilární elektroforézu v experimentech, před kterými nebylo na kapiláru aplikováno napětí, vypočtené podle rovnice (60) a z intervalu mezi vodivostním a UV detektorem.**

faktory		$\eta$	odchylka <sup>a</sup>
roztok	kapilára	/10 <sup>-3</sup> m*Pa*s	/%
1	25 µm	0,936 ± 0,009	18
1	50 µm	1,08 ± 0,007	5,2
2	25 µm	0,873 ± 0,003	17
2	50 µm	1,01 ± 0,001	4,4

<sup>a</sup> odchylka od hodnoty stanovené průtokovým viskozimetrem

Z uvedeného srovnání je zřejmé, že viskozity stanovené pomocí instrumentace pro kapilární elektroforézu jsou nižší než ty stanovené průtokovým viskozimetrem. Tento rozdíl je významně větší pro měření prováděná v užší kapiláře.

Výsledky pro kapiláru o průměru 50 µm jsou výrazně lepší – odchylka od referenčních hodnot je menší než 5,5 %. Naproti tomu viskozity stanovované v kapiláře o průměru 25 µm se od referenčních lišily až o 18 %. Velký rozdíl mezi viskozitami stanovenými v užší a širší kapiláře by mohl být způsoben například nepřesností průměru kapiláry udávaného výrobcem. Dalším působícím vlivem by mohl být rozdíl v charakteru vnitřního povrchu kapiláry, protože kapilára s vnitřním průměrem 25 µm pocházela od jiného výrobce než kapilára s průměrem 50 µm.

### Shrnutí

Z uvedených výsledků je možné usoudit, že instrumentace pro kapilární elektroforézu není příliš vhodná pro stanovování absolutních hodnot viskozit. To ale nemusí být zásadní pro fungování metody Williamse a Vigha [56], dvoudetektorové metody ani metody určení vzdálenosti jednoho z detektorů od začátku kapiláry [4]. Vyhodnocování všech těchto experimentů pracuje pouze s rychlostí protlačování při daném měření, zatímco nepřesnost absolutních hodnot viskozit může být dána nepřesností vnitřního průměru kapiláry deklarovaného výrobcem, který se ve vyhodnocování měření uvedenými metodami nepoužije.

Viskozity stanovené v kapiláře o vnitřním průměru 50 µm se od viskozit stanovených průtokovým viskozimetrem liší jen málo a tento rozdíl by neměl ohrozit dobré fungování uvedených metod i pokud by nebyl způsoben nepřesností deklarované hodnoty vnitřního

průměru, ale měl jinou příčinu. Uvedené metody je tedy lepší používat v kapilárách o vnitřním průměru 50  $\mu\text{m}$  než 25  $\mu\text{m}$ .

Z hlediska dvoudetektorové metody je podstatné, že volba intervalu na kapiláře neovlivňuje hodnotu stanovené viskozity. Pro výpočet korekční vzdálenosti  $L_{inj}$  (rozdíl skutečné vzdálenosti mezi zónou analytu a zónou markeru od vzdálenosti mezi začátkem kapiláry a vodivostním detektorem) je tedy možné použít rychlost protlačování stanovenou na základě doby, za kterou je zóna markeru protlačena od vodivostního k UV detektoru.

Horší preciznost viskozit stanovených na základě časových intervalů a předpokladu konstantního tlaku ukazuje, že pokud by se při výpočtu nepoužívala integrace tlakového záznamu, mohly by metody založené na protlačování při malém počtu měření poskytovat nepřesné výsledky. To se týká především metody Williamse a Vigha [56].

Ale z porovnání různých způsobů výpočtu mobilit stanovených dvou detektorovou metodou (viz kapitolu 4.1) vyplynulo, že rychlost protlačování a jednu ze dvou korekčních vzdáleností lze počítat bez použití integrace. To lze vysvětlit tím, že základem pro výpočet mobility je znalost geometrie (vzdáleností obou detektorů od začátku kapiláry) stanovená v samostatných experimentech vyhodnocovaných pomocí integrace tlaku. Při vlastních měřeních dvoudetektorovou metodou se pak pomocí rychlosti protlačování stanovují pouze malé korekce a jejich méně precizní výpočet s použitím časových intervalů namísto integrace už preciznost stanovené mobility významně neovlivní.

#### 4.3. Závislost mobility alkalických kationtů na koncentraci LiDS

V této práci byla sledována závislost mobility kationtů sodného, draselného a cesného na koncentraci dodecylsulfátu lithného (LiDS), přičemž všechny použité koncentrace tohoto detergentu byly vyšší než CMC. Měření byla prováděna v BGE o koncentraci LiDS 0 až 50 mM (iontová síla 77 až 78 mM, pH 7,14 až 7,18) a 0 až 100 mM (iontová síla 160 mM, pH 7,09, viz kapitolu 3.4.3).

Jako EOF marker byla v obou sadách měření použita thiomočovina. Dvoudetektorovou metodou bylo ověřeno, že je vhodným markerem pro systém obsahující micely LiDS (viz kapitolu 4.1).

V rámci této práce nebyla stanovována CMC, ale ve své bakalářské práci jsem pozorovala, že kritická micelární koncentrace LiDS v BGE obdobného složení (ale o iontové síle pouze 15,2 mM) nepřesahovala CMC 2,9 mM [63]. Protože nejnižší koncentrace LiDS použitá

v následujících experimentech byla 5 mM a protože CMC klesá s rostoucí iontovou silou (viz kapitulu 1.2), můžeme předpokládat, že ve všech použitých BGE obsahujících LiDS byly zformovány micely.

#### *Závislosti mobilit na koncentraci LiDS*

Závislost efektivní mobility na koncentraci interagující složky BGE je popsána rovnicí (27) uvedenou v kapitole 1.3:

$$u_{eff} = \frac{u_f + K'[L]u_c}{1 + K'[L]} \quad (27)$$

kde  $[L]$  je rovnovážná koncentrace interagující složky (ligandu),  $u_{eff}$  je mobilita analytu v BGE o dané koncentraci interagující složky  $L$ ,  $u_f$  je efektivní mobilita analytu v BGE bez této interagující složky,  $u_c$  efektivní mobilita komplexu analytu s ligandem (v tomto případě kationtu s micelou) při dané iontové síle,  $K'$  je zdánlivá konstanta interakce analytu a ligandu.

Za předpokladu, že úbytek ligandu komplexací s analytem je zanedbatelný ve srovnání s jeho analytickou koncentrací v BGE, lze touto analytickou koncentrací ligandu  $c_L$  nahradit koncentrací rovnovážnou:

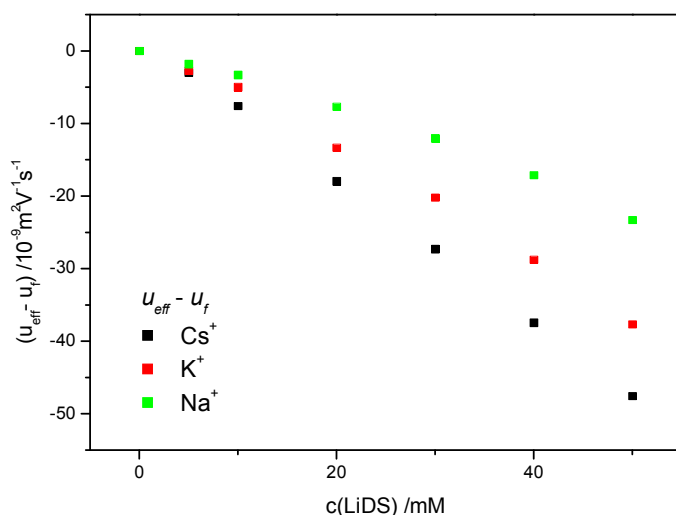
$$u_{eff} = \frac{u_f + K'c_Lu_c}{1 + K'c_L} \quad (61)$$

Při prokládání experimentálními daty (efektivní mobility analytu  $u_{eff}$  v BGE o koncentraci ligandu  $c_L$ ) má funkce (61) tři fitovací parametry. Vůči parametru  $u_f$  (mobilitě volného analytu) je fit málo robustní. Jeho hodnota je ale experimentálně dostupná jako efektivní mobilita v BGE bez interagující složky. Úpravou rovnice (61) do tvaru (62) pak lze získat vztah pouze se dvěma fitovacími parametry, který byl použit k vyhodnocování experimentálních dat v této práci.

$$u_{eff} - u_f = \frac{(u_c - u_f)K'c_L}{K'c_L + 1} \quad (62)$$

#### *Mobility kationtů v BGE o koncentraci LiDS 0 až 50 mM*

Stanovené mobility jednotlivých kationtů jsou uvedeny v Tabulka 15. V Graf 4 jsou vyneseny mobility kationtů, zmenšené o mobilitu příslušného kationtu v BGE bez LiDS ( $u_f$ ), na koncentraci LiDS.



**Graf 4:** Efektivní mobility ( $u_{eff}$ ) kationtů cesného, draselného a sodného zmenšené o mobilitu příslušného kationtu v BGE neobsahujícím micely ( $u_f$ ), (složení BGE uvedeno v Tabulka 3).

**Tabulka 15:** Mobility sledovaných kationtů v BGE o koncentraci LiDS 0 – 50 mM (složení BGE v Tabulka 3).

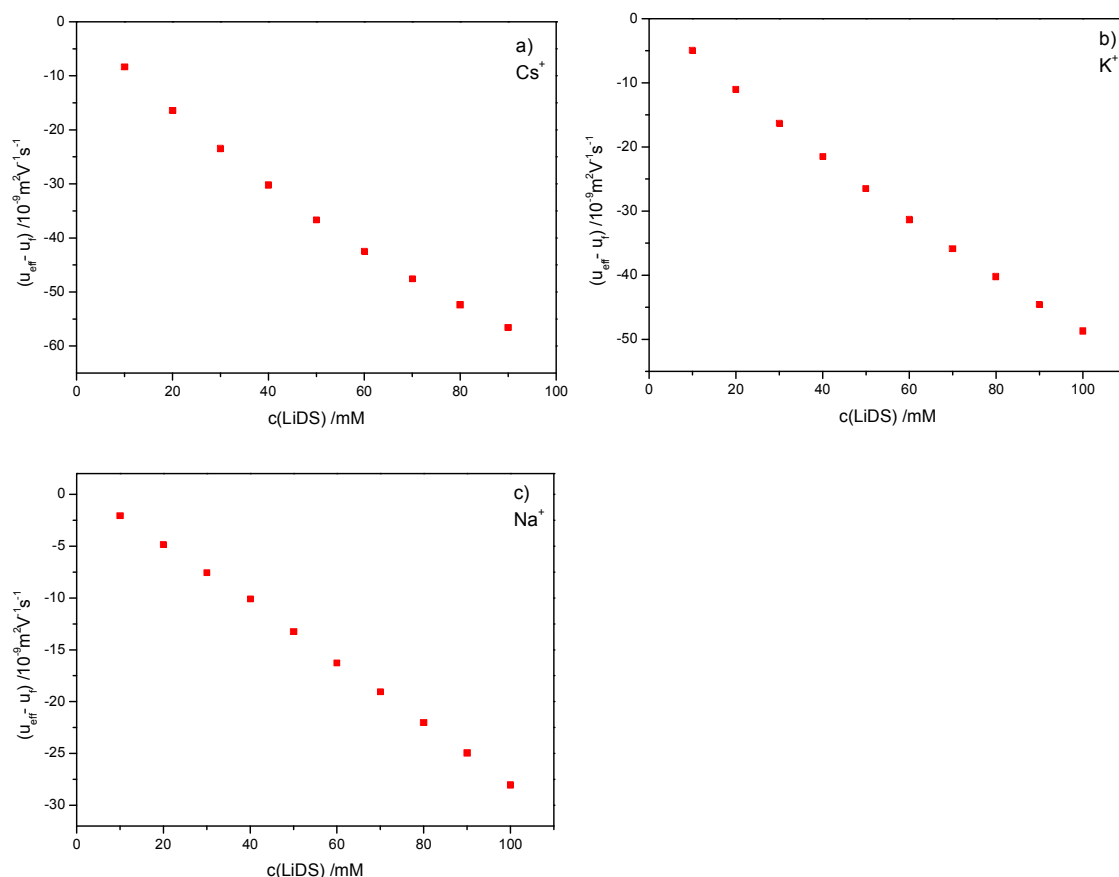
základní elektrolyt	c(LiDS) /mM	$u_{eff}(Cs^+)$ / $10^{-9} m^2 V^{-1} s^{-1}$	$u_{eff}(K^+)$ / $10^{-9} m^2 V^{-1} s^{-1}$	$u_{eff}(Na^+)$ / $10^{-9} m^2 V^{-1} s^{-1}$
BE00	0,0	68,2	67,1	46,3
BE05	5,0	65,2	64,3	44,5
BE10	10	60,6	62,1	43,0
BE20	20	50,2	53,7	38,6
BE30	30	40,9	46,9	34,2
BE40	40	30,7	38,3	29,1
BE50	50	20,6	29,4	23,0

\* pík nebylo možno vyhodnotit

Relativní směrodatná odchylka stanovených mobilit nepřesahovala 2 %.

Nejprudší pokles mobility s rostoucí koncentrací dodecylsulfátu vykazuje kationt cesný, nejmírnější pokles kationt sodný, což odpovídá tomu, že kationt cesný interaguje s micelami nejsilněji a kationt sodný nejslaběji. Tento trend v míře interakce alkalických kationtů s micelami LiDS jsem podrobněji rozebírala ve své bakalářské práci [63] a byl pozorován i jinými autory [25,64,65].

Závislost mobility konkrétního kationtu na koncentraci LiDS v BGE by měla být hyperbolická (viz kapitulu 1.3). Mobility kationtů v BGE do 50 mM koncentrace LiDS se ale jevily jako zcela lineární (Graf 4) a nevykazovaly hyperbolické prohnutí, což mohlo být způsobeno nedostatečným koncentračním rozsahem LiDS při slabé interakci analytu s ligandem. Proto byla provedena další série měření v BGE do 100 mM koncentrace LiDS.



**Graf 5: Závislost efektivní mobility ( $u_{eff}$ ) iontů a) cesného, b) draselného, c) sodného zmenšené o mobilitu příslušného kationtu v BGE neobsahujícím LiDS ( $u_f$ ) na koncentraci LiDS, (složení BGE uvedeno v Tabulka 4).**

**Tabulka 16: Efektivní mobility v BGE o koncentraci LiDS 0 – 100 mM (složení BGE v Tabulka 4).**

základní elektrolyt	$c(\text{LiDS})$ /mM	$u_{eff}(\text{Cs}^+)$ / $10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$	$u_{eff}(\text{K}^+)$ / $10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$	$u_{eff}(\text{Na}^+)$ / $10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$
MI00	0	66,6	64,8	44,1
MI10	10	58,3	59,9	42,0
MI20	20	50,3	53,8	39,3
MI30	30	43,2	48,5	36,6
MI40	40	36,5	43,3	34,0
MI50	50	29,9	38,3	30,9
MI60	60	24,2	33,5	27,8
MI70	70	19,0	29,0	25,1
MI80	80	14,3	24,6	22,1
MI90	90	10,0	20,3	19,1
MI100	100	-*	16,1	16,1

\* polohu píku nebylo možno odečíst, protože se nacházel příliš blízko systémového píku  
Relativní směrodatná odchylka stanovených mobilit nepřesahovala 1 %.

### Mobility kationtů v BGE o koncentraci LiDS 0 až 100 mM

Stanovené mobility jsou uvedeny v Tabulka 16. Závislost mobility na koncentraci LiDS pro draselný a cesný kationt vykazuje mírné, ale pozorovatelné hyperbolické prohnutí. Pro sodný kationt se ale závislost jeví jako zcela lineární (viz Graf 5).

### Vyhodnocení pro cesný a draselný kationt

Experimentální data pro cesný a draselný iont mají průběh hyperboly a bylo možné je proložit funkcí (62). Při vyhodnocování byly použity dva způsoby určení nezávisle proměnné  $c_L$  popsané v literatuře [49, 50].

Jednou z možností je použití koncentrace dodecylsulfátu zapojeného do micel  $c_{DS,M}$  [50]:

$$c_{DS,M} = (c_{DS} - c^*) \quad (63)$$

kde  $c_{DS}$  je koncentrace LiDS a  $c^*$  je CMC.

Pokud uvažujeme interakci kationtu s celou micelou, nikoli pouze s molekulou dodecylsulfátu do micely zapojenou, pak je koncentrace ligandu  $c_L$  rovna koncentraci micel  $c_M$ , která se zpravidla počítá podle vztahu (64) [49]:

$$c_M = \frac{(c_{DS} - c^*)}{N_{ag}} \quad (64)$$

kde  $N_{ag}$  je agregační číslo, pro LiDS rovno 76 [25].

Za CMC byla dosazena jednak 2 mM koncentrace LiDS jako nejvyšší relevantní hodnota CMC v těchto roztocích a při dané iontové síle. Jako druhý extrém byla CMC vůči celkové koncentraci detergentu zanedbána a za  $(c_{DS} - c^*)$  byla dosazována přímo koncentrace LiDS v příslušném BGE.

**Tabulka 17: Výsledky proložení závislosti ( $u_{eff} - u_f$ ) na  $c_L$  (viz text) funkcí (62).**

kationt	$c_L$	CMC <sup>a</sup> / mM	R <sup>2</sup>	$K' / M^{-1}$	$\frac{u_c - u_f}{/10^{-9} m^2 V^{-1} s^{-1}}$	$\frac{u_c}{/10^{-9} m^2 V^{-1} s^{-1}}$
Cs <sup>+</sup>	$c_{DS,M}$	0	0,9998	4,72 ± 0,19	− 191 ± 5,7	− 124
	$c_M$			359 ± 14		
	$c_{DS,M}$	2	0,99958	6,19 ± 0,30	− 160 ± 5,6	− 93,8
	$c_M$			470 ± 23		
K <sup>+</sup>	$c_{DS,M}$	0	0,99968	1,75 ± 0,17	− 328 ± 28	− 263
	$c_M$			133 ± 12,94		
	$c_{DS,M}$	2	0,99993	2,62 ± 0,09	− 238 ± 6,6	− 173
	$c_M$			199 ± 6,63		

<sup>a</sup> hodnota stanovena arbitrárně pro potřeby výpočtu (viz text)

Hodnoty parametrů  $K'$  a  $u_c$  získaných fitováním experimentálních dat pro cesný a draselný kationt jsou uvedeny v Tabulka 17.

Z těchto výsledků je zřejmé, že pokud použijeme při fitování funkcí (62) jako nezávisle proměnnou koncentraci dodecylsulfátu zapojeného do micel (63), nebo koncentraci micel spočtenou podle rovnice (64), obdržíme stejnou hodnotu koeficientu determinace ( $R^2$ ) a stanovené mobility komplexu kationtu s micelou, zatímco hodnoty  $K'$  se v závislosti na použité nezávisle proměnné řádově liší. Ale vydělením konstany  $K'$  získané pro závislost mobility na koncentraci micel agregačním číslem získáme stejnou hodnotu  $K'$ , jako při fitování závislosti mobility na koncentraci dodecylsulfátu zapojeného do micel. Skutečný vliv na stanovenou hodnotu parametrů funkce (62) má tedy pouze hodnota CMC.

#### *Vyhodnocení pro sodný kationt*

Závislost mobility sodného kationtu na koncentraci LiDS se jeví jako zcela lineární (viz Graf 5c) a funkcí (62) ji proložit nelze.

Pokud je komplexace velmi slabá, je i člen  $K'c_L$  velmi malý a v součtu ho lze zanedbat proti jedné. Pak funkce (62) přejde na lineární, jak je naznačeno na obrázku 8.

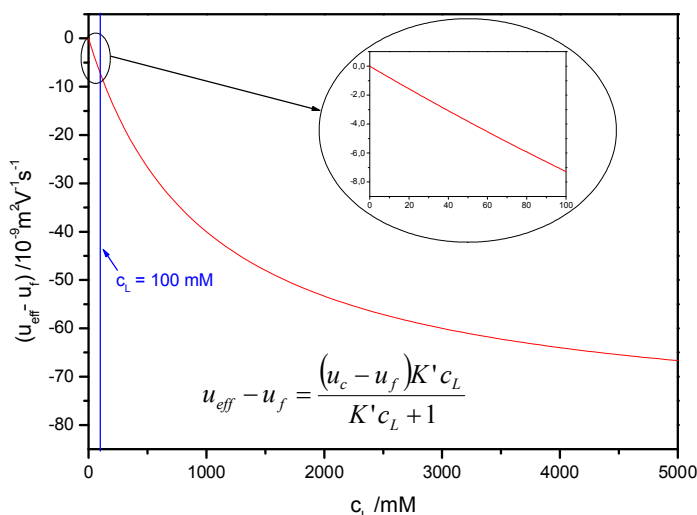
Za předpokladu, že  $K'c_L$  je mnohem menší než jedna, lze ze závislosti mobility na koncentraci LiDS (proložené lineární funkcí) alespoň odhadnout efektivní mobilitu komplexu kationtu s micelou  $u_c$  při dané iontové síle dle následujících vztahů:

$$\begin{aligned} u_{eff} &= u_f + (u_c - u_f)K'c_L; & K'c_L &= q \ll 1 \\ u_{eff} &= A + Bc_L \\ u_c &\cong \frac{B \cdot c_{L,max}}{q} + A \end{aligned} \tag{65}$$

kde  $A$  a  $B$  jsou úsek a směrnice lineární závislosti,  $q$  je arbitrárně stanovené číslo mnohem menší než jedna a  $c_{L,max}$  nejvyšší použitá koncentrace ligandu (dodecylsulfátu zapojeného do micel), ostatní symboly mají stejný význam jako v rovnici (62). Takto odhadnuté hodnoty jsou uvedeny v Tabulka 18.

Stejně jako v případě kationtů cesného a draselného byly použity hodnoty CMC 2 mM a 0 mM.





**Obrázek 8: Ilustrace přechodu hyperbolické funkce (62) na lineární při velmi slabé komplexaci;  $u_f = 40 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $u_c = -40 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $K' = 0,001 \text{ mM}^{-1}$ .**

**Tabulka 18: Mobility komplexu sodného kationtu s micelou odhadnuté podle vztahu (65).**

CMC <sup>a</sup> /mM	q	$u_c$ / $10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$
0	0,01	-2800
2	0,01	-2770
0	0,05	-523
2	0,05	-517

<sup>a</sup> hodnota stanovena arbitrárně pro potřeby výpočtu (viz text)

### Shrnutí

Mobility komplexů kationtu ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  a  $\text{Cs}^+$ ) s micelou získané jako fitovací parametry dle rovnice (62) nedávají dobrý fyzikální smysl. Mobilita micel dodecylsulfátu sodného udávaná v literatuře [29, 50, 51] se pohybuje kolem  $-40 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . Ve vodných roztocích jsou nejpohyblivější hydroxóniový kationt s limitní mobilitou  $362 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$  a hydroxidový aniont s limitní mobilitou  $-205 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$  [66], přičemž se předpokládá, že tyto ionty se pohybují jiným mechanismem než ionty solutů, a proto musí být mobilita solutů výrazně nižší. V tomto kontextu jsou mobility  $u_c$  uvedené v Tabulka 17 a 18 nesmyslně velké (zejména komplexy micely s  $\text{K}^+$  a  $\text{Na}^+$ ).

Také velké rozdíly mezi  $u_c$  stanovenými pro jednotlivé kationty naznačují, že tento parametr nemá ve skutečnosti význam mobility komplexu kationtu s micelou a že tedy rovnice (62) správně nepopisuje závislost efektivní mobility alkalických kationtů na koncentraci dodecylsulfátu (ani hodnotu parametru  $K'$  pak nelze považovat za zdánlivou interakční konstantu kationtu s ligandem).

Vysvětlením může být, že s rostoucí koncentrací detergentu se mění parametry micel (velikost, frakční náboj) a tedy i jejich mobilita nebo síla interakce mezi kationtem a micelou. V takovém případě nejsou parametry funkce (62) konstantní a ta tedy nemůže být použita k vyhodnocení experimentálních dat.

Přestože se řada autorů zabývala vlivem koncentrace detergentu nebo množství a druhu přidaného elektrolytu na vlastnosti micel (agregační číslo a frakční náboj, viz kapitolu 1.2), nepodařilo se nám v literatuře najít model, který by umožňoval odhadnout parametry micel ve vícesložkových základních elektrolytech, jaké se používají v kapilární elektroforéze.

Zjištěná závislost mobility alkalických kationtů na koncentraci dodecylsulfátu lithného je překvapivá a její hlubší zhodnocení bude vyžadovat další studium.

## 5. Závěr

- Byla navržena nová dvoudetektorová metoda stanovení efektivní mobility analytů v základních elektrolytech obsahujících interagující složku. Tato metoda eliminuje možnou interakci EOF markeru se složkami BGE a tak umožňuje stanovit zcela přesné hodnoty mobilit analytů, které jsou nezbytné k určování fyzikálně chemických parametrů z elektroforetických měření. Metoda je založena na stejném principu jako metoda popsaná Williamsem a Vighem [56], ale je proveditelná v komerčně dostupných aparaturách. Další výhodou navržené dvoudetektorové metody je, že neklade takové nároky na přesnost a stabilitu aplikovaného tlaku. Migrační vzdálenost analytu je určována na základě známé vzdálenosti detektorů na kapiláře a rychlost protlačování je používána pouze k výpočtu malých korekcí. Fluktuace tlaku tedy ovlivní výsledky získané dvoudetektorovou metodou jen nepatrně.

Metoda byla navržena pro BGE obsahující micely, ale je vhodná i pro stanovení přesné mobility analytů v systémech obsahujících i jiné interagující složky (například cyklodextriny nebo makrocyclická antibiotika), kde není vhodné použití neutrálního markeru vzhledem k jeho možné mobilizaci interakcí se složkou BGE.

- Touto metodou byly stanoveny mobility sodného kationtu v BGE o koncentracích dodecylsulfátu lithného v rozmezí 0 až 70 mM. Byly posouzeny různé způsoby vyhodnocení experimentálních dat získaných navrženou metodou a bylo ukázáno, že může být použita většina diskutovaných zjednodušení, což výrazně usnadňuje výpočet mobilit. Porovnáním mobilit stanovených touto metodou s mobilitami stanovenými klasickou zónovou elektroforézou bylo ověřeno, že thiomocovina je vhodným markerem elektroosmotického toku pro měření v BGE obsahujícím dodecylsulfátové micely.

- V další části práce byl ověřen vliv některých experimentálních faktorů a způsobů zpracování dat na stanovení hodnoty viskozity pomocí instrumentace pro kapilární elektroforézu. Na základě těchto měření byl diskutován i vliv fluktuací tlaku na metody založené na aplikaci tlaku během experimentů v kapiláře. Bylo zjištěno, že instrumentace pro kapilární elektroforézu není příliš vhodná pro stanovování absolutních hodnot viskozit a poskytuje nižší hodnoty viskozity než referenční metoda (průtoková viskozimetrie), což může být způsobeno například nepřesným průměrem kapilár pro kapilární elektroforézu. Nicméně při použití kapiláry o vnitřním průměru 50  $\mu\text{m}$  je odchylka od referenční hodnoty malá.

Integrace časového záznamu průběhu tlaku je vhodnější způsob výpočtu viskozity, jelikož poskytuje výsledky s menší směrodatnou odchylkou. Z hlediska dvoudetektorové metody je podstatné, že nebyl pozorován vliv volby úseku na kapiláře, z něhož je viskozita stanovována, na výslednou hodnotu viskozity. Tak i rychlost protlačování může být určena pomocí libovolného detektoru na kapiláře nebo jejich kombinace.

Nepřesnost absolutních hodnot viskozit stanovených kapilární elektroforézou by neměla ovlivnit dobré fungování dvoudetektorové metody, protože tato metoda pracuje pouze s rychlostmi protlačování, tudíž nevyžaduje znalost přesné hodnoty vnitřního průměru kapiláry.

- Byly změřeny závislosti efektivních mobilit alkalických kationtů cesného, draselného a sodného na koncentraci dodecylsulfátu lithného v rozsahu koncentrací a 0 až 100 mM s použitím EOF markeru thiomocoviny, jejíž vhodnost byla ověřena dvoudetektorovou metodou. Z vyhodnocení vyplývá, že tyto závislosti nevyhovují všeobecně používanému modelu pro interakce různých analytů s micelami a při vyhodnocení pomocí tohoto modelu poskytují nereálné hodnoty mobilit komplexů. Toto zjištění bude podnětem k dalšímu studiu.

## Literatura

---

- [1] Riekkola M.-L., Joensson J. A., Smith R. M.: *Pure Appl. Chem.* **2004**, 76, 443-451
- [2] Katayama H., Ishihama Y., Asakawa N.: *Anal. Chem.* **1998**, 70, 2254-2260
- [3] Muijsallaar W. G. H. M.: *Micellar electrokinetic chromatography – fundamentals and applications*, Eindhoven University of Technology, Eindhoven 1996
- [4] Včeláková K., Zusková I., Kenndler E., Gaš B.: *Electrophoresis* **2004**, 25, 309-317
- [5] Rundlett K. L., Armstrong D. W.: *Anal. Chem.* **1995**, 67, 2088-2095
- [6] Gaš B., Jaroš M., Hruška V., Zusková I., Stědrý M.: *LC-GC Eur.* **2005**, 18, 282-288
- [7] Gaš B., Zuska J., Coufal P., van de Goor T.: *Electrophoresis* **2002**, 23, 3520-3527
- [8] Atkins P., Paule J.: *Atkins ' Physical Chemistry (eighth edition)*, Oxford university press, Oxford 2006
- [9] Brdička R., Dvořák J.: *Základy fyzikální chemie*, s. 545. Academia, Praha 1977
- [10] Koval D., Kašička V., Zusková I.: *Electrophoresis* **2005**, 26, 3221-3231
- [11] Surway M. A., Goodall D. M., Wren S. A. C., Rowe R. C.: *J. Chromatogr., A* **1996**, 741, 99-113
- [12] Onsager L., Fuoss R. M.: *J. Phys. Chem.* **1932**, 36, 2689-2778
- [13] Jaroš M., Včeláková K., Zusková I., Gaš B.: *Electrophoresis* **2002**, 23, 2667-2677
- [14] Ušelová-Včeláková K., Zusková I., Gaš B.: *Electrophoresis* **2007**, 28, 2145-2152
- [15] Süß F., Sängner-van de Griend C. E., Scriba G. K. E.: *Electrophoresis* **2003**, 24, 1069-1076
- [16] Hsiao J.-Y., Wu S.-H., Ding W.-H.: *Talanta* **2006**, 68, 1252-1258
- [17] Tian K., Zhang H., Chen X., Hu Z.: *J. Chromatogr., A* **2006**, 1123, 134-137
- [18] Kawaoka J., Gomez F. A.: *J. Chromatogr., B* **1998**, 715, 203-210
- [19] Gaš B., Hruška V., Dittmann M., Bek F., Witt K.: *J. Sep. Sci.* **2007**, 30, 1435-1445
- [20] Stědrý M., Jaroš M., Hruška V., Gaš B.: *Electrophoresis* **2004**, 25, 3071-3079
- [21] Jaroš M., Hruška V., Stědrý M., Zusková I., Gaš B.: *Electrophoresis* **2004**, 25, 3080-3085
- [22] Lokajová J., Hruška V., Tesařová E., Gaš B.: *Electrophoresis* **2008**, 29, 1189-1195
- [23] Stědrý M., Jaroš M., Včeláková K., Gaš B.: *Electrophoresis* **2003**, 24, 536-547
- [24] Hruška V., Jaroš M., Gaš B.: *Electrophoresis* **2006**, 27, 984-991
- [25] Joshi J. V., Aswal V. K., Bahadur P., Goyal P. S.: *Curr. Sci.* **2002**, 83, 47-49
- [26] Shanks P. C., Franses E. I.: *J. Phys. Chem.* **1992**, 96, 1794-1805
- [27] Ropers M. H., Czichocki G., Brezesinski G.: *J. Phys. Chem. B* **2003**, 107, 5281-5288
- [28] Cifuentes A., Bernal J. L., Diez-Masa J. C.: *Anal. Chem.* **1997**, 69, 4271-4274
- [29] Jacquier J. C., Desbene P. L.: *J. Chromatogr., A* **1995**, 718, 167-175
- [30] Lin C.-E., Fang I.-J., Deng Y.-J., Liao W.-S., Cheng H.-T., Huang W.-P.: *J. Chromatogr., A* **2004**, 1051, 85-94
- [31] Bezzobotnov V. Y., Borbely S., Cser L., Farago B., Gladkih I. A., Ostanevich Y. M., Vass S.: *J. Phys. Chem.* **1988**, 92, 5738-5743
- [32] Jacquier J. C., Desbène P. L.: *J. Chromatogr., A* **1996**, 743, 307-314

- 
- [33] Romani A. P., Machado A. E. H., Hioka N., Severino D., Baptista M. S., Codognoto L., Rodrigues M. R., de Oliveira H. P. M.: *J. Fluoresc.* **2009**, *19*, 327-332
- [34] Dutkiewicz E., Jakubowska A.: *Colloid Polym. Sci.* **2002**, *280*, 1009-1014
- [35] Bendedouch D., Chen S. H., Koehler W. C.: *J. Phys. Chem.* **1983**, *87*, 2621-2628
- [36] Hall D. G.: *Langmuir* **1999**, *15*, 3483-3485
- [37] Bales B. L., Messina L., Vidal A., Peric M., Nascimento O. R.: *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102*, 10347-10358
- [38] Burchfield T. E., Woolley E. M.: *J. Phys. Chem.* **1984**, *88*, 2149-2155
- [39] Terabe S., Otsuka K., Ichikawa K., Tsuchiya A., Ando T.: *Anal. Chem.* **1984**, *56*, 111-113
- [40] Terabe S., Otsuka K., Ando T.: *Anal. Chem.* **1985**, *57*, 834-841
- [41] Wiedmer S. K., Lokajová J., Riekkola M.-L.: *J. Sep. Sci.* **2010**, *33*, 394-409
- [42] Rundlett K. L., Armstrong D. W.: *Electrophoresis* **1997**, *18*, 2194-2202
- [43] Kaneta T., Tanaka S., Taga M., Yoshida H.: *Anal. Chem.* **1992**, *64*, 798-801
- [44] Katsuta S., Nakatani T.: *J. Colloid Interface Sci.* **1997**, *195*, 404-407
- [45] Breadmore M. C., Macka M., Haddad P. R.: *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 1826-1833
- [46] Jimidar M., Bourguignon B., Massart D. L.: *Anal. Chim. Acta* **1995**, *310*, 27-42
- [47] Lin C.-E., Hsueh C.-C., Wang T.-Z., Chiu T.-C., Chen Y.-C.: *J. Chromatogr., A* **1999**, *835*, 197-207
- [48] Takayanagi T., Motomizu S.: *J. Chromatogr., A* **2007**, *1141*, 295-301
- [49] Takayanagi T., Ikuta A., Motomizu S.: *Anal. Sci.* **2010**, *26*, 625-627
- [50] Lin C.-E., Lin W.-C., Chen Y.-C., Wang S.-W.: *J. Chromatogr., A* **1997**, *792*, 37-47
- [51] Tellez A., Weiss V. U., Kenndler E.: *Electrophoresis* **2008**, *29*, 3916-3923
- [52] Nair U. B., Rundlett K. L., Armstrong D. W.: *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **1997**, *20*, 203-216
- [53] Wang W., Zhou F., Zhao L., Zhang J.-R., Zhu J.-J.: *J. Chromatogr., A* **2007**, *1170*, 1-8
- [54] Fuguet E., Rafols C., Bosch E., Roses M.: *Electrophoresis* **2002**, *23*, 56-66
- [55] Van de Goor A. A. A. M., Wanders B. J., Everaerts F. M.: *J. Chromatogr.* **1989**, *470*, 95-104
- [56] Williams B. A., Vigh G.: *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 4445-4451
- [57] Wang T., Hartwick R. A.: *J. Chromatogr.* **1992**, *594*, 325-334
- [58] Huang X., Gordon M. J., Zare R. N.: *Anal. Chem.* **1988**, *60*, 1837-1838
- [59] Xiong J., Xu G., Zhang P., Zheng Y., Zhang Y.: *Talanta* **2002**, *57*, 1093-1100
- [60] Lee T. T., Dadoo R., Zare R. N.: *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 2694-2700
- [61] Haahrhoff P. C., van der Linde H. J.: *Anal. Chem.* **1966**, *38*, 573-582
- [62] Erny G. L., Bergstroem E. T., Goodall D. M., Grieb S.: *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 4862-4872
- [63] Müllerová L.: *Bakalářská práce*, Univerzita Karlova v Praze, Praha **2009**
- [64] Ahuja E. S., Foley J. P.: *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 2315-2324
- [65] McLaren D. G., Boulat O., Chen D. D. Y.: *Electrophoresis* **2002**, *23*, 1912-1920
- [66] Vohlřídál J., Julák A., Štulík K.: *Chemické a analytické tabulky*, s. 566. Grada, Praha 1999